UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE VON BINDEGEWEBSPROTEINEN IN KULTUREN VERSCHIEDENER LEBERZELLFRAKTIONEN

Erarbeitung eines Tiermodelles und seine Anwendung an humanen Zellen aus normalen und fibrosierenden Lebern

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

Vorgelegt von
Diplom Biologin
Petra B. Krauledat
aus Nienburg/Weser

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544708_0021

UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE VON BINDEGEWEBSPROTEINEN IN KULTUREN VERSCHIEDENER LEBERZELLFRAKTIONEN

Erarbeitung eines Tiermodelles und seine Anwendung an humanen Zellen aus normalen und fibrosierenden Lebern

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

Vorgelegt von
Diplom Biologin
Petra B. Krauledat
aus Nienburg/Weser

Referent: Prof. Dr. L.M.G. Heilmeyer jr.

Korreferent: Prof. Dr. A. Ruthmann

Dekan: Prof. Dr. H. Ch. Lüttgau

Tag der mündlichen Prüfung: 17.7. 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Biologie der Ruhr-Universität Bochum

Danksagungen

Für das Zustandekommen der vorliegenden Arbeit bin ich zu besonderem Dank verpflichtet:

Herrn Prof. Dr. LMG Heilmeyer jr. für die Begutachtung der Arbeit

Herrn Prof. Dr. A. Ruthmann für die Übernahme des Korreferates

Herrn Dr. med. EG Hahn und der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die mir im Rahmen des Projektes Ha 956/4 das Thema der Arbeit überließen und den Arbeitsplatz zur Verfügung stellten, und Herrn Dr. Hahn besonders für die Diskussion der klinischen Aspekte der Problemstellung

Herrn Prof. Dr. H Kern und Herrn Dr. P Rathke, Institut für Cytobiologie der Universität Marburg, für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen und besonders für die hilfreiche Diskussion der zellbiologischen Probleme der Arbeit

Herrn Dr. H Rohde, Chirurgische Klinik der Universität Marburg, für die Bereitstellung von Teilen diagnostischer Leberkeilbiopsien

Herrn Dr. H Weinmann, Behring-Werke, Marburg, für die Überlassung von neugeborenen Affen

den Mitarbeitern der Abteilung für Bindegewebsforschung des Max-Planck-Institutes für Biochemie, Martinsried, in deren Institut ich die Methoden zur Bindegewebsproteinanalyse und die Zellkultur erlernte

der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die mir Kongressreisen finanzierte, wodurch ich vor allem die biochemischen Probleme der Arbeit diskutieren konnte.

VERÖFFENTLICHUNGEN

Ein Teil der hier vorliegenden Ergebnisse ist an folgenden Stellen veröffentlicht, bzw. zur Veröffentlichung akzeptiert worden:

KRAULEDAT, PB, HAHN, EG, STÖLZING, H, ROHDE, H und MARTINI, GA (1980)
Isolation and characterization in primary culture of non-parenchymal cells from human and monkey livers as a tool in the study of fibrotic liver disease
Acta Hepatologia-Gastroenterologica, Proceedings of the XI International Congress of Gastroenterology, 231

KRAULEDAT, PB, RATHKE, P, STÖLZING, H, KERN, HF, ROHDE, H und HAHN, EG (1980)
Characterization in primary culture of connective tissue producing cells from the liver: isolation of distinct cell types from man and monkey by density gradient centrifugation
Vortrag beim:
VII. European Symposium on the Connective Tissue Research, Alan R Liss, New York (im Druck)

KRAULEDAT, PB, Rohde, H, SCHALK, A, MARTINI, GA und HAHN, EG
Isolation and characterization of distinct cell types from normal and fibrotic liver of man and monkey: production of connective tissue proteins
In: Connective Tissue of the Normal and Fibrotic Human Liver
Gerlach, U, Kühn, K, Popper, H, Hrg. Thieme, Stuttgart (im Druck)

ABKÜRZUNGEN

Folgende Abkürzungen wurden zusätzlich zu den von der IUPAC - IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature empfohlenen (Eur. J. Biochem. 1, 259-266) verwendet:

Ci	Curie
DTE	1,4-Dithioerytrit
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec^2)
OD	optische Dichte
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Bindegewebe in der Leber	1
1.2.	Regulation der pathologisch gesteigerten Bindegewebsbiosynthese bei der Leberfibrose	3
1.3.	Struktur und Biosynthese des Kollagens	5
1.4.	Problemstellung	11
2.	METHODEN	15
2.1.	Präparative Methoden	15
2.1.1.	Desintegration von Lebergewebe	15
2.1.2.	Gewinnung von Hautfibroblasten	16
2.1.3.	Gewinnung von glatten Muskelzellen aus Aorta	16
2.1.4.	Gewinnung von Gefäßendothelzellen aus der Vena cava	17
2.1.5.	Zelltrennung durch Dichtegradientenzentrifugation	17
2.1.6.	Primärkultur von Leberzellen	18
2.1.7.	Einbau von ^{3}H-Prolin in Proteine von Zellen in Primärkultur	19
2.1.8.	Extraktion von radioaktiv markierten Bindegewebsproteinen	20
2.1.9.	DEAE-Chromatographie von Bindegewebsproteinen	20
2.1.10.	Pepsinabbau von Kollagenen	21
2.1.11.	Reinigung von Typ I und III Kollagenen	21
2.1.12.	Reinigung von Typ V Kollagen	22
2.1.13.	Herstellung von Antikörpern gegen Typ IV	22
2.1.14.	Herstellung des Substrates zur Bestimmung der Prolinhydroxylase	23
2.1.15.	Herstellung des Substrates zur Bestimmung der Lysinoxidase	24
2.2.	Analytische Methoden	26
2.2.1.	Zählung von Zellen in Suspension	26
2.2.2.	Zählung von adhärenten Zellen	26
2.2.3.	Bestimmung des Zellwachstums durch Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA	26

2.2.4.	Gradientengelelektrophorese zur Trennung von Kollagenketten	27
2.2.5.	Fluorographie	28
2.2.6.	Plattengelelektrophorese zur Trennung stark aggregierender Proteine	29
2.2.7.	Densitometrie	29
2.2.8.	Immunpräcipitation	30
2.2.9.	Immundoppeldiffusion	30
2.2.10.	Bestimmung der Prolinhydroxylaseaktivität	31
2.2.11.	Bestimmung der Lysinoxidaseaktivität	32
2.2.12.	Referenzproteine für die Elektrophorese	34
2.2.13.	Dokumentation der Phasenkontrastmikroskopie	34
2.2.14.	Indirekte Immunfluoreszenz	34
3.	ERGEBNISSE Teil I: Etablierung eines Tiermodelles	36
3.1.	Isolierung von zwei nicht parenchymatischen Zellfraktionen aus Lebern	36
3.1.1.	Vorbereitung der Leberzellen für die Dichtegradientenzentrifugation	36
3.1.2.	Trennung verschiedener Zelltypen über Dichtegradientenzentrifugation	37
3.2.	Morphologische Beschreibung der isolierten Zellfraktionen	42
3.2.1.	Differenzierung durch Phasenkontrastmikroskopie	42
3.2.2.	Feinstruktur der Primärkulturzellen	48
3.3.	Wachstumsverhalten von Myofibroblasten und endothelialen Zellen in Primärkultur	56
3.3.1.	Adhärens der Zellen	56
3.3.2.	Proliferation der Zellen	56
3.4.	Qualitative Analyse der Biosynthese von Bindegewebsproteinen in Zellkulturen	61
3.4.1.	Markierung der Biosyntheseprodukte mit ^{3}H-Prolin	61
3.4.2.	Trennung von Bindegewebsproteinen aus Zellkulturmedium durch DEAE-Chromatographie	64
3.4.3.	Analyse von Laminin	70

3.5.	Quantitative Analyse der Biosynthese von Bindegewebsproteinen in Zellkulturen	73
3.5.1.	Isolierung und vergleichende Quantifizierung von Prokollagen Typ IV	73
3.5.2.	Isolierung und vergleichende Quantifizierung von Typ I und III Kollagenen	74
3.5.3.	Isolierung und vergleichende Quantifizierung von Typ V Kollagen	82
3.5.4.	Vergleichende Quantifizierung von Fibronektin	84
3.6.	Bestimmung von kollagensynthetisierenden Enzymen in Zellkulturen	86
3.6.1.	Bestimmung der Prolinhydroxylase	86
3.6.2.	Bestimmung der Lysinoxidase	88
4.	ERGEBNISSE Teil II: Anwendung der in Teil I an Hand des Tiermodelles beschriebenen Methoden auf gesunde und fibrosierende Humanlebern	92
4.1.	Differenzierung der Problemstellung	92
4.2.	Isolierung von Myofibroblasten und endothelialen Zellen aus Humanleber	94
4.3.	Morphologische Beschreibung der Zellen aus Humanleber	95
4.4.	Wachstumsverhalten der Humanleberzellen in der Primärkultur	99
4.4.1.	Adhärens der Humanleberzellen	99
4.4.2.	Proliferation der Humanleberzellen	101
4.5.	Analyse der Biosynthese von Bindegewebsproteinen in Primärkulturen von Humanleberzellen	103
4.5.1.	Vergleich der Biosyntheseprodukte aus Myofibroblasten und endothelialen Zellen aus normaler und fibrotischer Leber	104
4.5.2.	Trennung von Bindegewebsproteinen aus Myofibroblastenkulturmedium durch DEAE-Chromatographie	107
4.5.3.	Bestimmung des Verhältnisses von Typ I zu Typ III Kollagen in Kulturen von Humanlebermyofibroblasten	110
4.5.4.	Vergleichende Bestimmung von Typ V Kollagen in Myofibroblastenkulturen	115

4.5.5.	Vergleichende Quantifizierung von Fibronektin in Myofibroblasten durch Immunpräcipitation	117
4.5.6.	Vergleichende Quantifizierung von Typ IV Kollagen in Myofibroblasten durch Immunpräcipitation	119
4.6.	Bestimmung von kollagensynthetisierenden Enzymen in Humanlebermyofibroblasten	122
4.6.1.	Bestimmung der Prolinhydroxylase	122
4.6.2.	Bestimmung der Lysinoxidase	124
5.	DISKUSSION	127
5.1.	Isolierung und morphologische Charakterisierung von Myofibroblasten und endothelialen Zellen	127
5.2.	Wachstumsverhalten der Zellen in Primärkultur	134
5.3.	Bindegewebsbiosynthese in der Primärkultur	136
5.3.1.	Lokalisierung der Biosyntheseprodukte in der Zellkultur	137
5.3.2.	Trennung der Kollagene durch DEAE-Chromatographie	139
5.3.3.	Biosyntheseraten von Typ I und III Kollagen	143
5.3.4.	Bedeutung der Basalmembranenproteine Typ IV und V Kollagen, Fibronektin und Laminin bei der Leberfibrose	151
5.4.	Kollagenbiosynthetisierende Enzyme	159
5.5.	Entwicklung eines Regulationsmodells zur Leberfibrose	163
6.	ZUSAMMENFASSUNG	167
7.	LITERATURVERZEICHNIS	169

1. EINLEITUNG

Obwohl die Bedeutung des fibrillären Bindegewebes beim Aufbau, der Abgrenzung und Fixierung aller Organe der Wirbeltiere, beim Aufbau der äußeren Gestalt und der Übertragung von Kräften schon lange bekannt ist (1), stammen die erfolgreichen Ansätze zur Aufklärung seiner biochemischen Struktur und der Regulation seiner Synthese erst aus den letzten Jahren (2). Im Rahmen dieser Arbeiten ist das Kollagen die derzeit am besten charakterisierte Bindegewebssubstanz (3,4), d.h. es ist bis zu seinen Aminosäuresequenzen und zu seinem molekularbiologischen Ursprung untersucht worden, während über andere Bindegewebsproteine wie das Elastin und die die amorphe Grundsubstanz bildenden Glykoproteine und Proteoglycane bisher nur relativ wenige Daten veröffentlicht wurden (5). Die ersten und die meisten dieser Untersuchungen wurden an bindegewebsreichen Organen, wie z.B. der Haut, den Sehnen oder am Knorpel durchgeführt.

1.1. Bindegewebe in der Leber

Das Interesse am Bindegewebe der Leber wurde durch das klinische Bild verschiedener Lebererkrankungen geweckt. Hierbei wurde eine kontinuierliche Verfestigung des im gesunden Zustand weichen parenchymatösen Organs registriert. In den letzten Jahren ist experimentell abgesichert worden, daß dieser Vorgang auf einer Steigerung der Biosynthese des im gesunden Organ nur geringen Anteils an Bindegewebe in der Leber beruht (6). Diese Bindegewebsvermehrung wurde Fibrogenese, der daraus resultierende pathologische Zustand Leberfibrose genannt. Wie in den anderen

Organen ist auch in der Leber das Kollagen das am besten untersuchte Bindegewebsprotein. Es gibt bislang nur wenige Ansätze zur Klärung der Rolle der Proteoglycane bei der Leberfibrose (7). Eine mögliche Bedeutung der Glycoproteine Fibronektin und Laminin bei der Fibrogenese wird nur in einer immunologisch morphologischen Arbeit aufgezeigt (8).

In der gesunden Leber sind Typ I, III und IV Kollagen sowie Fibronektin und Laminin ausschließlich außerhalb des Parenchyms lokalisiert worden (8,9,1o,11). Typ I Kollagen wird im Portaltrakt, in der Umgebung der Lebervenenverzweigungen und in einigen dünnen Fasern in der Matrix des Leberläppchens gefunden (9,11). Typ III Kollagen tritt als locker verteiltes Netzwerk an den gleichen Stellen auf (9,11). Typ IV Kollagen bildet eine Schicht (Basalmembran) um die Blutgefäße und Gallengänge des Portalfeldes und um die Zentralvene und wird in geringen Mengen entlang der Sinusoide gefunden, wobei letzterer Befund jedoch umstritten ist (8,1o,11). Fibronektin ist Bestandteil der Basalmembran der Gefäße des Portalfeldes und wird darüberhinaus im perisinusoidalen Raum gefunden (8).

Die Lokalisation der Proteine in der fibrotischen Leber ist bislang nicht derart genau zu definieren. Es wird eine Vermehrung von basalmembranenähnlichen Strukturen entlang der Sinusoide beobachtet (12). Typ III Kollagenfasern scheinen in der Matrix der Hepatozyten in der Nähe der Sinusoide abgelagert zu werden (13). Im fibrosierenden Gewebe ist eine exakte Zuordnung der kollagenproduzierenden Zellen zum ursprünglich parenchymatischen und zum

ursprünglich nicht parenchymatischen Gewebe schwierig (8,9). So konnte zwar häufig die gesteigerte Biosynthese von Kollagenen bei der Leberfibrose beschrieben werden, jedoch blieb dabei in allen Arbeiten die Regulation und der zelluläre Ursprung dieses pathologischen Vorganges weitgehend Spekulation (14,15,16,17).

1.2. Regulation der pathologisch gesteigerten Bindegewebsbiosynthese bei der Leberfibrose

Nach dem heutigen Kenntnisstand könnten die folgenden zellulären Mechanismen für die vermehrte Kollagenbiosynthese bei der Leberfibrose diskutiert werden:

1. Zellen, die in gesundem Gewebe kein Kollagen synthetisieren, werden zur Synthese angeregt.
2. Die Kollagenbiosynthese wird gesteigert, ohne daß eine erhebliche Proliferation der synthetisierenden Zellen stattfindet.
3. Die Proliferation der kollagensynthetisierenden Zellen nimmt erheblich zu, während die Kollagensyntheserate der einzelnen Zelle nicht wesentlich verändert ist.

Die erste Hypothese muß wohl nach allen bisher gefundenen Ergebnissen ausgeschlossen werden, da die einzigen Zellen, die in der normalen Leber kein Kollagen synthetisieren können, die Hepatozyten sind. Es existieren zwar einige immunfluoreszenzoptische Daten, die scheinbar eine Kollagensynthese im Parenchym der fibrotischen Leber zeigen, jedoch konnte dabei die Einwanderung von Zellen nicht parenchymatischen Ursprungs nicht ausgeschlossen werden, zumal diese scheinbar Kollagen synthetisierenden Hepatozyten vorwiegend am Rand des Läppchenparenchyms bzw. im perisinusoidalen Raum gefunden wurden (8,9,13). Es ist bisher auch nicht

gelungen, in frisch isolierten Hepatozyten aus fibrotischer Leber Kollagenbiosynthese nachzuweisen (18), sondern lediglich in Hepatozytenzellinien, die in ihrer Biosyntheseleistung, wie alle Zellinien, weit vom in vivo Zustand einer Zelle im Gewebeverband entfernt sind (19). Demzufolge ist die Kollagenbiosynthese wahrscheinlich auch in der fibrotisch veränderten Leber auf Zellen nicht parenchymatischen Ursprungs beschränkt. Gegen die Annahme der zweiten Hypothese als alleinige Grundlage sprechen die Ergebnisse der Untersuchungen von Kivirikko und Mitarbeitern, Prockop und Mitarbeitern und anderen (16,2o,21,22,23,24). Die von diesen Autoren gemessenen Steigerungen der Enzymaktivitäten der an der Kollagenbiosynthese beteiligten intrazellulären Enzyme in fibrotischen Zellen können nicht zu Kollagenmengen in der gefundenen Größenordnung führen.

Aus den genannten Gründen ist als Arbeitshypothese zur Regulation der Entwicklung der Leberfibrose wohl ein Zusammenspiel von stärkerer Proliferation der kollagensynthetisierenden Zellen und erhöhter Syntheserate der einzelnen Zelle anzunehmen. Eine derartige Arbeitshypothese wird auch durch die bereits erwähnten immunfluoreszenzoptischen Daten zur Lokalisierung der Kollagene in der fibrotischen Leber unterstützt, die auf der einen Seite eine Ausweitung der kollagenhaltigen Zonen in der Leber und auf der anderen Seite auch eine kräftigere Immunreaktion in den Zellen und vor allem der Zellmatrix zeigen (8,9).

Um einen genauen experimentellen Ansatz zur weiteren Aufklärung des Regulationsmechanismus der Steigerung der Kollagenbiosynthese bei der Fibrogenese zu formulieren, soll zunächst die Struktur

und Biosynthese des Kollagens, wie sie bislang aufgeklärt wurde, umrissen werden.

1.3. Struktur und Biosynthese des Kollagens

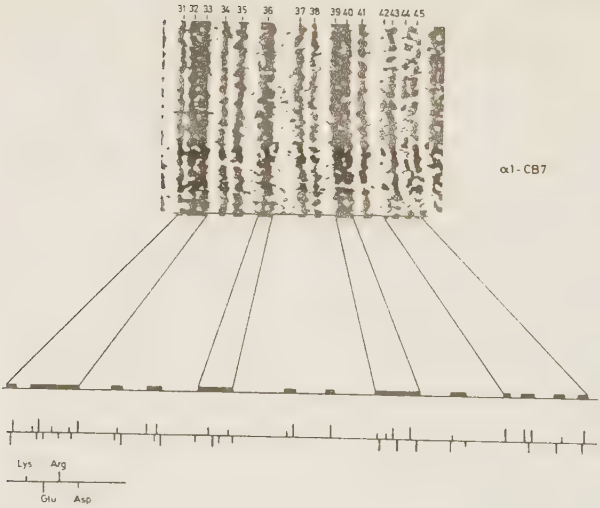
Die im tierischen Körper am häufigsten auftretende Struktur des Kollagens ist, wie bereits erwähnt, die Kollagenfibrille, deren Struktur und Synthese im folgenden kurz umrissen werden soll. Obwohl mittlerweile 5 verschiedene Kollagentypen bekannt sind, die in unterschiedlichen Geweben auch von unterschiedlicher Bedeutung sind, ist die Grundstruktur aller Kollagenfibrillen gleich.

Ein Kollagenmolekül besteht aus drei gleichen oder im Falle von Typ I und Typ V Kollagen auch leicht unterschiedlichen sog. α-Ketten, die im nativen Zustand in der Konformation einer Tripelhelix vorliegen (25). Eine α-Kette enthält ein zentrales Coreprotein mit der streng repetitiven Aminosäuresequenz $(Gly\text{-}X\text{-}Y)_n$, wobei in X-Position häufig Prolin, in Y-Position oft Hydroxyprolin gefunden wird. Nur dieses Coreprotein ist Teil des tripelhelikalen Tropokollagens, wobei im Zentrum der Helix die Glycinmoleküle gelegen sind, die mit ihren Aminogruppen Wasserstoffbrücken zu den Carboxylgruppen des Prolins oder einer anderen Aminosäure einer jeweils anderen α-Kette der Helix ausbilden (3). Ein dem Coreprotein anhängender N-terminaler und ein C-terminaler Peptidrest ohne die genannte Tripeptidanordnung in seiner Sequenz ist für die Quervernetzung bei der späteren Fibrillenbildung von Bedeutung. Für den sog. "self-assembly" Prozess der Fibrillenbildung, noch ohne Quervernetzung, sind die Aminosäuren in Position X und Y verantwortlich: Die Tropokollagenmoleküle lagern sich in

Abb. 1

A.
Abbildung nach MÜLLER und KÜHN (28).

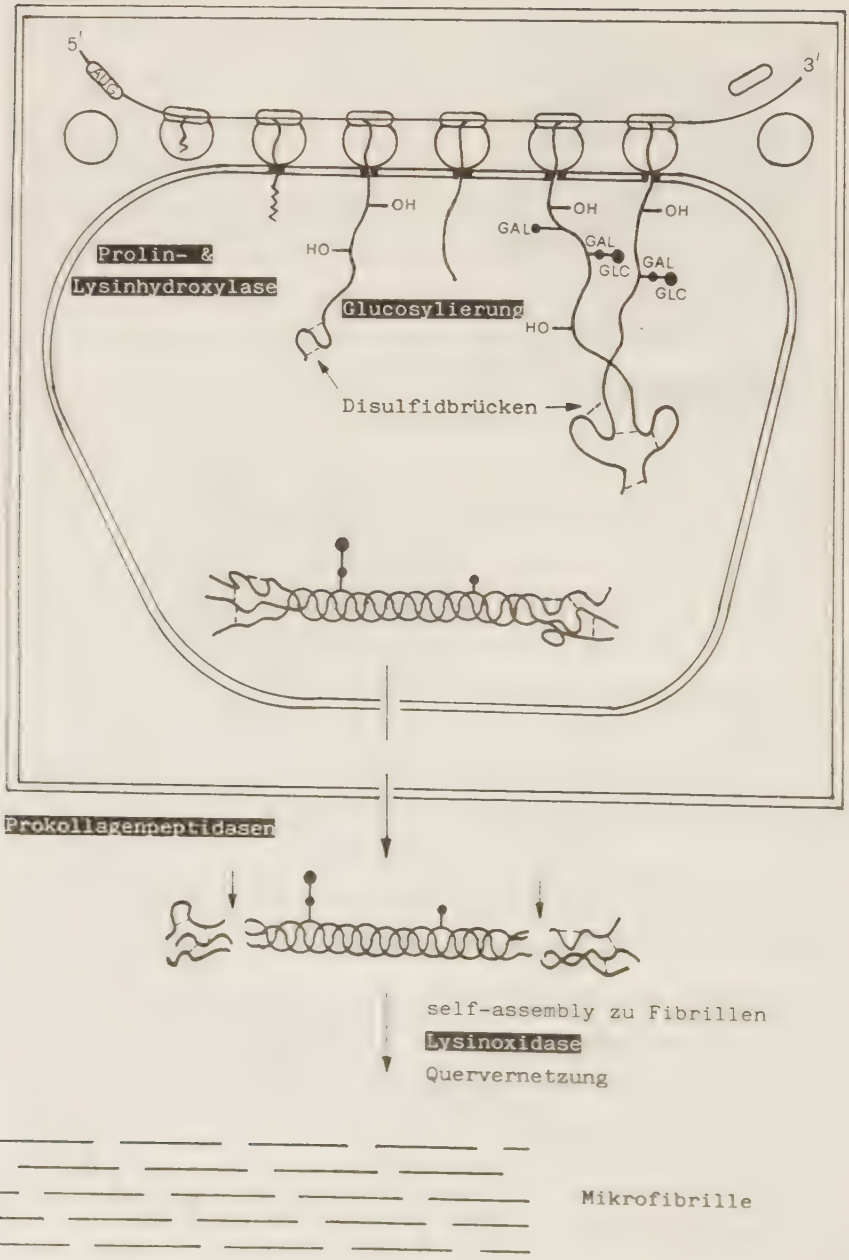
Typ I Kollagenfibrillen nach Anfärbung mit Phosphorwolframsäure und Uranylacetat elektronenmikroskopisch dargestellt.



B.
Abbildung nach K. KÜHN (29).
Vergleich der Aminosäuresequenz eines Bromcyanbruchstückes von Typ I Kollagen mit der schematischen Darstellung des elektronenmikroskopisch gefundenen Querstreifungsmusters des entsprechenden Abschnittes aus einer Typ I Kollagenfibrille.

der Weise aneinander, daß jeweils die polaren Aminosäuren Lysin, Arginin, Glutaminsäure und Asparaginsäure aggregieren. Durch dieses Aggregationsprinzip werden die einzelnen Kollagenmoleküle innerhalb der Fibrille um ein Viertel ihrer Länge gegeneinander verschoben (Abb. 2) (26). Die im Elektronenmikroskop nach Anfärbung mit Phosphorwolframsäure und Uranylacetat beobachtete typische Querstreifung der Kollagenfibrillen (27) ist auf diese Aggregation der polaren Aminosäuren, die die Metallsalze binden und so dunkle Banden im elektronenoptischen Bild zeigen, zurückzuführen (Abb. 1). Eine zweite Rolle bei der Fibrillenaggregation spielen die hydrophoben Aminosäuren. Betrachtet man ihre Positionen in der Sequenz, unterstützen sie die oben beschriebene Aggregation der polaren Reste (29). Zusätzliche Stabilität wird den Fibrillen durch kovalente intermolekulare Quervernetzungen gegeben. Eingeleitet wird dieser Prozess durch Oxidation der Epsilon Aminogruppe bestimmter Lysin-und Hydroxylysin-Reste zu Aldehyden. Im einfachsten Fall reagieren solche Aldehyde mit Lysinresten benachbarter Kollagenmoleküle zu Aldiminbindungen. Um die einzelnen Kollagenmoleküle in der Länge einer Fibrille zu verbinden, haben die dem Coreprotein anhängenden nicht helikalen Peptide eine Bedeutung. Auch hier reagieren Aldehydfunktionen am Ende dieser terminalen Peptide mit einem Lysinrest des nächsten oder einer benachbarten Tripelhelix (Abb. 2). Auf diese Quervernetzungsreaktionen soll jedoch in diesem Rahmen nicht näher eingegangen werden, da sie kaum eine Bedeutung bei der Problemstellung der vorliegenden Arbeit haben (für eine Übersicht siehe 3o).

Abb.2 Schema der Kollagenbiosynthese



Im Rahmen dieser Arbeit sind vielmehr die intrazellulären Vorgänge der Biosynthese der Tripelhelix, die Ausschleusung der Kollagenmoleküle aus der Zelle und die die Fibrillenbildung einleitenden Schritte von Interesse. Alle diese Vorgänge sind in Abb. 2 in einem Schema zusammengefaßt: Vorausgesetzt, daß der intrazelluläre Pool an Prolin ausreichend ist, wird im ersten Biosyntheseschritt die Sequenz der α-Ketten nach den Gesetzmäßigkeiten der Translation einer zur Sekretion bestimmten Polypeptidkette gebildet. Bereits während die neugebildete Kette noch an den Polysomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums anhaftet, beginnt die enzymatische Hydroxylierung verschiedener Prolin-und Lysinreste (31,32), worauf sofort die Ausbildung der Tripelhelix beginnt. Diese wird durch die Bildung kovalenter Disulfidbrücken im Bereich der zuerst translatierten nichthelikalen N-terminalen Abschnitte der späteren α-Kette eingeleitet (33). Der nächste Schritt ist die Glykosylierung einiger Hydroxylysinreste des Prokollagenmoleküls nach vollständiger Translation. Zunächst werden Galaktosereste angeknüpft; anschließend wird an einige dieser Galaktosemoleküle noch Glucose in $1 \rightarrow 2$ Verknüpfung gebunden. Zwei verschiedene Glycosyltransferasen sind an diesem Prozess beteiligt (34). Die glycosylierten Prokollagenmoleküle in den Membranvesikeln werden jetzt aus der Zelle ausgeschleust. Dieser Sekretionsprozess ist einer der am wenigsten untersuchten Schritte der Kollagenbiosynthese. Es gibt lediglich einige Hinweise auf die Beteiligung des Mikrotubuli-Systems an diesem Vorgang (35,36).

Extrazellulär wird der Prozess der Fibrillenbildung durch die enzymatische Abspaltung der durch Disulfidbrücken verknüpften terminalen Peptidstücke durch spezifische Prokollagenpeptidasen (37) eingeleitet. Nun kann das zu Beginn beschriebene "self-assembly" der Tropokollagene zu Fibrillen ablaufen. Ein letztes Enzym, die Lysinoxidase, ist eingeschaltet, um die ebenfalls bereits beschriebene Quervernetzung innerhalb der neuen Fibrille vorzubereiten (38).

Als letzter Punkt der Kollagenbiosynthese ist noch die Ausprägung der verschiedenen Kollagentypen zu erwähnen. Es gilt heute als gesichert, daß diese bereits auf der Translationsebene festgelegt werden. Einzelheiten, vor allem die Regulation betreffend, sind jedoch immer noch sehr widersprüchlich und Ziel umfangreicher molekularbiologischer Untersuchungen (39,4o,41). Auch auf diese soll aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht näher eingegangen werden. Wichtig ist jedoch der Hinweis auf die Struktur der bisher bekannten Kollagentypen und ihr Vorkommen im normalen Gewebe, denn die Betrachtung der Kollagenmuster erlaubt möglicherweise Rückschlüsse auf pathologische Vorgänge. Wie bereits erwähnt sind bislang 5 verschiedene Kollagentypen bekannt: Typ I Kollagen, dessen Tropokollagenmolekül aus zwei identischen α_1-Ketten und einer davon abweichenden kleineren α_2-Kette zusammengesetzt ist $\left[\alpha_1(I)\right]_2\alpha_2$, ist nahezu universell verteilt, besonders stark aber im Knochen und in der Haut vertreten. Typ II Kollagen kommt lediglich im Knorpel vor und braucht deshalb an dieser Stelle nicht weiter betrachtet zu werden. Typ III Kollagen besteht aus 3 identischen α_1-Ketten

$[\alpha_1(III)]_3$, die sich in ihrem Molekulargewicht kaum von der α_1-Kette des Typ I Kollagens unterscheiden. Es tritt in großen Mengen in der Haut und in den Arterienwänden auf, wird darüberhinaus jedoch auch in den meisten Geweben gefunden. Typ IV Kollagen enthält ebenfalls drei identische α_1-Ketten $[\alpha_1(IV)]_3$ und ist das typische Basalmembranenkollagen. Typ V Kollagen, welches ebenfalls in Basalmembranen anzutreffen ist, darüberhinaus aber noch in Muskelzellen und anderen Geweben, ist aus zwei αB und einer αA-Kette zusammengesetzt. Beide Ketten haben ein höheres Molekulargewicht als die α_1 und α_2-Ketten (33,42).

1.4. Problemstellung

Nach der voranstehenden Einführung soll im folgenden ein experimenteller Ansatz entwickelt werden, der die Aufklärung der Regulation der pathologisch gesteigerten Kollagenbildung in der Leber einen Schritt weiterbringen soll.

Die in Abb. 2 weiß auf schwarzem Grund dargestellten Schritte der Kollagenbiosynthese sind bereits mehrfach in gesundem und fibrotischem Lebergewebe untersucht worden. Alle posttranslationalen Enzyme weisen im fibrotischen Gewebe der Leber eine erhöhte Aktivität auf (16,21,23,24,43,44). Mit diesen Ergebnissen korreliert die Messung eines erhöhten Kollagenspiegels in fibrosierendem Lebergewebe (17,24). Auch auf Translationsebene zurückzuführende Verschiebungen in den Anteilen der einzelnen Kollagentypen am Gesamtkollagen wurden gezeigt (45,46,17). Es sind verschiedene Versuche unternommen worden, einzelne Schritte der Kollagenbiosynthese zu hemmen und somit den fibrotischen Prozess aufzuhalten (47,48,49,5o). Die Hoffnung auf eine therapeutische

Anwendbarkeit dieser Methoden bei der Leberfibrose erscheint jedoch in höchstem Maße zweifelhaft, da auf Grund der zu Beginn beschriebenen universellen Verteilung des Kollagens im ganzen Körper die Leberfibrose zwar möglicherweise aufgehalten werden kann, es jedoch mit Sicherheit zu schweren Schädigungen anderer Organe kommt. Aus den genannten Gründen erscheint es zwingend notwendig, das Grundlagenwissen über die Kollagenbiosynthese, speziell in der fibrotischen Leber, zu erweitern.

Als erstes muß die Frage nach der kollagensynthetisierenden Zelle erneut aufgeworfen werden. Bislang war nur die Eingrenzung, daß die Kollagenbiosynthese, auch wenn sie pathologisch verändert ist, von den nicht parenchymatischen Zellen ausgeht, möglich. Eine Aufgabe im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte es sein, eine oder mehrere der nichtparenchymatischen Zellarten zu isolieren und die Kollagenbiosynthese an Hand ihrer Produkte und vor allem der Zwischenprodukte, wie die Prokollagene, und an Hand des intrazellulären Enzyms Prolinhydroxylase sowie des extrazellulären Enzyms Lysinoxidase in der Zellkultur einer homogenen Zellpopulation zu untersuchen. Nur so erschien es möglich, sich der zu Beginn vorgeschlagenen Regulationshypothese anzunähern (s. 1.2.) Zum einen können Untersuchungen zur Proliferation bestimmter Zellarten nur an homogenen Zellpopulationen durchgeführt werden; zum anderen ist nur in der Zellkultur mit Hilfe von radioaktiven Markierungsexperimenten und Hemmung des Abbaus eine exakte Erfassung der tatsächlichen Kollagenbiosyntheseleistungen möglich. Die quantitative Bestimmung von Biosyntheseprodukten, in diesem Fall die mengenmäßige Aussage über

die verschiedenen Kollagentypen im Gewebe, greift immer nur einen einzigen Moment aus dem Gleichgewicht von Biosynthese und Abbau heraus, wobei unklar bleibt, ob der gemessene Status auf eine gesteigerte Biosynthese oder einen verringerten Abbau oder beides zurückzuführen ist. Eine gesteigerte Kollagenbiosynthese kann zwar auch mit Hilfe von Enzymmessungen direkt im Gewebe beobachtet werden; im Fall des Kollagens ist jedoch so nur die Veränderung der Gesamtkollagenmenge bestimmbar, aber keinerlei Aussage über die Veränderung im Muster der Kollagentypen, das für die Aufklärung der Regulation von großer Wichtigkeit sein könnte, zu machen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die soeben beschriebenen Untersuchungen im Hinblick auf die Leberfibrose beim Menschen durchzuführen. Da mit der Reinigung einzelner nichtparenchymatischer Zellpopulationen die Etablierung einer völlig neuen Methode anstand, war es jedoch unmöglich, die Arbeiten mit dem nur in sehr geringem Umfang verfügbaren humanen Gewebematerial zu beginnen. Außerdem war zwar bei Beginn der Arbeit die Untersuchung der Kollagenbiosynthese in Zellkulturen, z.B. von glatten Muskelzellen, bereits von verschiedenen Autoren beschrieben (51,52,53), jedoch gab es noch keinerlei Anhaltspunkte über die Anwendbarkeit dieser Methoden in Leberzellkulturen. Aus diesen Gründen wurde das Ziel der Arbeit erst einmal auf die Erarbeitung eines Tiermodells zur Etablierung aller Methoden im Mikromaßstab modifiziert. Als besonders glücklicher Umstand ist dabei die Möglichkeit des Aufbaues eines Primatenmodells an Hand von neugeborenen Affen der Art Macaca fascicularis, die freundlicherweise von den Behringwerken (Marburg) zur Verfügung gestellt wurden, herauszu-

stellen. Diese Tatsache ist ein besonderer Vorteil gegenüber den bislang häufig bearbeiteten Rattenmodellen, deren Ergebnisse nur sehr schwer auf den Menschen übertragen werden können. In Vorversuchen zu dieser Arbeit konnten bereits einige Daten gesammelt werden, nach denen, zumindestens nach morphologischen Gesichtspunkten, eine sehr gute Vergleichbarkeit von humanen Leberzellen und Affenleberzellen zu erwarten war. Auch die Ausprägung von experimentellen Fibrosen bei Ratten (54) und bei Affen (55) ließen im Vergleich mit der Fibrose beim Menschen den Schluß zu, daß die in einem Affenmodell etablierten Methoden eine sehr viel direktere Anwendbarkeit auf menschliches Gewebe mit sich bringen würden.

In den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wird im ersten Teil die Etablierung einer neuen Methode zur Gewinnung von homogenen Zellpopulationen aus der Leber, sowie die Analyse der Bindegewebsproteinbiosynthese dieser Zellen in Kultur an dem Tiermodell neugeborener Affen vorgestellt werden. In einem zweiten Teil wird an ausgewählten Beispielen aus diesem Modell seine Anwendbarkeit auf humanes Lebergewebe im Vergleich von gesunden und fibrotischen Lebern gezeigt werden.

2. METHODEN

2.1. Präparative Methoden

2.1.1. Desintegration von Gewebe aus Leber von neugeborenen Affen bzw. aus Humanleber

Alle Arbeiten werden ausschließlich mit sterilem Besteck, sterilen Gefäßen und sterilen Lösungen immer in einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt.

Ganze Lebern werden aus neugeborenen Affen der Art Macaca fascicularis herauspräpariert. Die großen Gefäße sowie alle bindegewebigen Teile werden sorgfältig entfernt. Anschließend wird das Naßgewicht der Lebern bestimmt. Chirurgische Keilbiopsien[1)] aus Humanleber werden sofort, noch im Operationssaal, steril in MEM Dulbecco Medium (Seromed, München) überführt und ins Labor transportiert. Das Leberkapselgewebe wird mit einem Skalpell abpräpariert. Dann wird das Naßgewicht des Leberstückchens bestimmt.

Alle folgenden Arbeitsschritte werden für Affen- und Humanleber identisch ausgeführt:

1g Lebergewebe wird in einer Petrischale mit 1ml MEM Dulbecco Medium versetzt und mit einer Hautschere in möglichst kleine Stückchen zerschnitten. 5ml Kollagenaselösung (4mg/ml Dulbecco Medium; Kollagenase von Worthinghton, München) werden sterilfiltriert. Die Leberstückchen werden in die Kollagenaselösung überführt und

---

1) Ein Teil der Biopsie wurde zur pathologischen Begutachtung abgetrennt. Hierbei wurde das Vorhandensein bzw. der Grad einer fibrotischen Veränderung bestimmt. Die Begutachtungen wurden von Prof. Kalbfleisch, pathologisches Institut der Universitätsklinik Marburg, durchgeführt.

6o min bei 37°C unter mäßigem Schütteln inkubiert. Die Zellen müssen dann sofort weiterverarbeitet werden, um eine Schädigung der Zellmembran durch die Kollagenase zu vermeiden.

2.1.2. Gewinnung von Hautfibroblasten aus Haut von neugeborenen Affen (56)

Von den unter 2.1.1. beschriebenen Affen wird ein ca. 1 cm^2 großes Hautstückchen steril abpräpariert, vom Fell befreit und in MEM Dulbecco Medium gewaschen. Die Haut wird in 1o kleine Stückchen mit einem Skalpell zerteilt. In eine Zellkulturflasche von 75 cm^2 Bodenfläche werden die Stücke mit der ehemals äußeren Hautschicht nach oben ausgepflanzt. In die senkrecht stehende Flasche wird 15 ml Hams F12-Medium (Seromed, München), komplettiert, mit o,1 mg/ml Streptomycin, 1oo E/ml Penecillin, 5omg/ml Ascorbinsäure und 2µ Mol/ml L-Glutamin sowie 1o % fötalem Kälberserum, einpipettiert, ohne die Hautstückchen abzuschwemmen. Die Flasche wird senkrecht für 3o Min. in den sterilen 37°C Brutschrank gestellt, danach erst waagerecht gelegt, so daß das Medium die ausgepflanzte Haut bedeckt. Nach dieser Vorbehandlung schwimmen die Stückchen nicht mehr ab. Bei wöchentlichem Mediumwechsel ist nach ca. 4o bis 5o Tagen eine konfluente Fibroblastenkultur erreicht.

2.1.3. Gewinnung von glatten Muskelzellen aus Aorta von neugeborenen Affen

Aorten werden aus neugeborenen Affen (Macaca fascicularis) steril herauspräpariert, das Gewicht bestimmt und in MEM Dulbecco Medium (Seromed, München) sorgfältig gewaschen und in kleine Stücke geschnitten. 1mg Aortengewebe wird dann, wie unter 2.1.1. für Leber

beschrieben, in 5ml Kollagenaselösung desintegriert. Die Inkubationszeit verlängert sich lediglich um 2o Min. auf 8o Min. bei 37°C. Die desintegrierten Zellen werden durch ein steriles feines Sieb filtriert, um sie von den Zellklümpchen abzutrennen, 2 Min. bei 2oo x g abzentrifugiert und sofort 3 mal mit jeweils 2o ml MEM Dulbecco Medium gewaschen, um die Kollagenase zu entfernen. Die so gewonnenen Zellen werden dann nach der unter 2.1.6. beschriebenen Methode in Primärkultur genommen.

2.1.4. Gewinnung von Gefäßendothelzellen aus der Vena cava von neugeborenen Affen

Ein Stück der entlang der Wirbelsäule freipräparierten Vena cava wird mit chirurgischen Fäden abgebunden. Eine Spritze mit einer möglichst dünnen Kanüle wird mit Kollagenaselösung (s. 2.1.1.) gefüllt. Die Kollagenase wird vorsichtig ohne das Gefäß zu verletzen in die Vene gespritzt und 2o Min. bei Zimmertemperatur inkubiert. Mit Hilfe einer dickeren Kanüle wird die Kollagenaselösung einschließlich der abgelösten Zellen wieder aus der Vene herausgesaugt. Die Zellen werden 2 Min. bei 2oo x g abzentrifugiert und 2 mal mit MEM Dulbecco Medium gewaschen. Sie werden nach der unter 2.1.6. beschriebenen Methode in Primärkultur genommen. Für ein Kulturgefäß mit 25 cm^2 Bodenfläche werden die Zellen aus zwei Venen benötigt.

2.1.5. Zelltrennung durch Dichtegradientenzentrifugation (57)

Die Osmolarität von PERCOLL (Pharmacia, Uppsala) wird mit 1o-fach konzentriertem MEM Dulbecco Medium eingestellt. Zu diesem Zweck werden 9 Teile Percoll mit 1 Teil Medium vermischt. Mit dieser

Ausgangslösung wird dann mit normal konzentriertem MEM Dulbecco Medium eine 9o oder 6o%ige bzw. eine 1o oder 2o%ige (w/w) Percollösung hergestellt. Aus je 15ml einer hochprozentigen und einer niedrigprozentrigen Percollösung wird ein kontinuierlicher Dichtegradient gemischt. Die durch Kollagenaseabbau gewonnene Zellsuspension (s. 2.1.1.) wird 5 min bei 4°C sedimentiert (58). 6ml des Überstandes werden auf die Oberfläche des Gradienten aufgetragen und in einem Swing-out-Rotor 3o min bei 15oo x g zentrifugiert. Die einzelnen Banden werden mit einer Einmalspritze und einer Kanüle von o,9 mm Durchmesser abgesaugt und in Zentrifugenbecher überführt. Es wird 2 mal mit ca. 1oml MEM Dulbecco Medium gewaschen, um Percoll- und Kollagenasereste zu entfernen. Die Zellen werden jeweils 5 min. bei 2oo x g abzentrifugiert.

2.1.6. Primärkultur von Leberzellen

Die nachgereinigten Zellfraktionen (s. 2.1.2. bis 2.1.4.) werden in einer Dichte von ca. o,3 x $1o^6$ Zellen pro Kulturflasche mit 25 cm^2 Grundfläche bzw. von ca. o,6 x $1o^6$ Zellen pro Flasche mit 75 cm^2 Grundfläche eingesät. In die Kulturflaschen werden 4 bzw. 15ml HAM s-F12 Medium (Seromed, München) mit 15 % fötalem Kälberserum (Seromed, München), o,1 mg/ml Streptomycin und 1oo E/ml Penecillin, 5o mg/ml Ascorbinsäure und 2µ Mol/ml L-Glutamin gegeben und bei 37°C in einer Atmosphäre von 95 % Luft und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. Das Kulturmedium wird, wenn nicht anders angegeben, nach drei Tagen zum

ersten Mal gewechselt, danach alle zwei Tage, bis die Zellen bis zur Konfluenz gewachsen sind. Das Zellwachstum wird täglich mikroskopisch kontrolliert.

2.1.7. Einbau von ^{3}H -Prolin in Proteine von Zellen in Primärkultur modifiziert nach Burke et al. (52)

Leberzellkulturen einen Tag vor Konfluenz und vollständig konfluente Leberzellkulturen (s. 2.1.6.) werden unter sterilen Bedingungen 24 Std. bei 37°C mit folgendem Medium vorinkubiert: HAM's-F12 Medium mit 15 % fötalem Kälberserum (s. 2.1.6.), jedoch ohne Streptomycin.
Anschließend wird zum Einbau der radioaktiven Aminosäure gegen das folgende Medium gewechselt: 1oo ml MEM Dulbecco (Seromed, München), 5mg Ascorbinsäure, 15 mg ß-Aminopropionitrilfumarat, 4o.ooo E Penecillin, 1o µCi/ml 2,3- ^{3}H -Prolin. Das Medium wird filtersterilisiert, das radioaktive Prolin wird unsterilisiert direkt in die Kulturflaschen gegeben. Der Einbau wird 24 Std. bei 37°C durchgeführt, danach werden 1o µl/ml Medium der folgenden Proteaseinhibitorenmischung zugesetzt: Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid (PMSF), 3 mg/ml 5o %igem Aceton; p-Mercuribenzoat, 3 mg/ml H_2O; EDTA, 1o mg/ml o.1 M NaOH. Das Medium wird sofort abgegossen. Zur Gewinnung der Zellen wird der Boden der Kulturflaschen ausgesägt und die Zellen in 5 bis 1o ml 5o mM Tris-HCl, 1 M NaCl pH 7,4 mit einem Teflonspatel abgekratzt. Wie beim Medium werden Proteaseinhibitoren zugegeben.

2.1.8. Extraktion von radioaktiv markierten Bindegewebsproteinen aus Medium und Zellen nach Primärkultur (59)

Das nach 2.1.7. gewonnene Medium wird 24 Std. gegen das 2oo-fache Volumen 5o mM Tris-HCl, o,5 M NaCl, pH 7,4 dialysiert. Das Dialysat enthält die Bindegewebsproteine.
Die Zellsuspension (s.2.1.7.) wird 3 x 5 sec. bei höchster Energie mit Ultraschall homogenisiert und anschließend 24 Std. gegen das 2oo-fache Volumen 5o mM Tris-HCl, 1 M NaCl, ph 7,4 dialysiert. Das dialysierte Homogenat wird 3o Min. bei 15.ooo x g abzentrifugiert. Der Überstand enthält die neutralsalzlöslichen Kollagene und die Prokollagene. Das Pellet wird in o,1 M CH_3 COOH suspendiert und 12 Std. gegen das 5oo-fache Volumen o,1 M CH_3COOH dialysiert. Das Dialysat wird abzentrifugiert und der Überstand lyophilisiert. Er enthält die säurelöslichen Kollagene. Im dialysierten Medium und im Überstand des dialysierten Zellhomogenates wird in jeweils 1o µl-Proben die Radioaktivität bestimmt. Einbau ins Gesamtprotein von ca. 8o % der eingesetzten Radioaktivität ist für Bindegewebsproteinanalysen notwendig. Das dialysierte Material kann bei -2o°C über mehrere Monate gelagert werden.

2.1.9. DEAE-Chromatographie von radioaktiv markierten Bindegewebsproteinen nach Nowack et al. (6o)

Ein Drittel des aus einer Kulturflasche mit 75 cm^2 Bodenfläche gewonnenen, nach 2.1.5. vorbereiteten Mediums wird mit 3 mg/ml säurelöslichem Typ I Kollagen aus Babyhaut versetzt und auf eine DEAE-Säule (1,5 x 8 cm), die mit 5o mM Tris-HCl, 2 M Harnstoff,

pH 8,4 äquilibriert ist, aufgetragen. Es wird mit dem 2-fachen Säulenvolumen des gleichen Puffers gewaschen. Das an die DEAE-Cellulose gebundene Protein wird mit einem Gradienten von O bis 3oo mM NaCl in Äquilibrierungspuffer eluiert. Durchlauf und Eluat werden in 2 ml Fraktionen gesammelt. In jeder Fraktion wird die OD_{28o} und die Radioaktivität in einem 5o µl Aliquot gemessen. Radioaktivität enthaltende Peaks werden vereinigt, gegen 5o mM Tris-HCl, pH 7,4 dialysiert und lyophilisiert. Die Lyophilisate können bei -2o °C über mehrere Monate gelagert werden.

2.1.1o. Pepsinabbau von Kollagenen nach Burke et al. (52)

Nach 2.1.8. aufgearbeitetes Kulturmedium oder Zellextrakt wird 15 Std. gegen das 3oo-fache Volumen an o,5 M Essigsäure dialysiert. Das Dialysat wird mit o,3 mg/ml Pepsin vom Schwein (29oo E/mg, Serva, Heidelberg) versetzt und 15 Std. bei 4 °C unter sehr langsamem Schütteln, um mechanische Denaturierung des Proteins zu vermeiden, abgebaut. Denaturiertes Protein wird 6 Min. bei 5o.ooo x g abzentrifugiert.

2.1.11. Reinigung von Typ I und Typ III Kollagenen durch fraktionierte Salzfällung (61,62)

Ausgehend von dialysierten Kulturmedien bzw. den Zellextrakten (s. 2.1.8.) wird ein Pepsinabbau, wie unter 2.1.7. beschrieben, durchgeführt. Der Pepsinabbau wird durch Erhöhung des pH auf 8,o mit 1 M NaOH gestoppt. Durch darauffolgende Dialyse gegen das 5oo-fache Volumen an o,1 M Essigsäure wird wieder ein saurer pH hergestellt (ca. 2,5). Aus dem Dialysat wird durch Zugabe von festem NaCl bis zu einer Konzentration von o,7 M und 16stündiges

Rühren bei 4 °C in Gegenwart von NaCl das Typ III Kollagen präcipitiert. Das Präcipitat wird 1o Min. bei 5o.ooo x g abzentrifugiert. Der Überstand wird durch weitere Zugabe von festem NaCl auf 2,7 M gebracht und nochmals 16 Std. langsam gerührt. Das gebildete Präcipitat, das das Typ I Kollagen enthält, wird 1o Min. bei 5o.ooo x g abzentrifugiert. Beide Präcipitate werden in Elektrophoresepuffer aufgenommen und nach 2.2.6. und 2.2.7. analysiert.

2.1.12. Reinigung von Typ V Kollagen nach Rhodes und Miller (63)

Typ V Kollagen wird aus dialysiertem Kulturmedium oder Zellextrakt (s.2.1.8.) gereinigt. Zunächst wird 1 mg/ml säurelösliches Typ I Kollagen aus Babyhaut als Carrier zugegeben und anschließend ein Pepsinabbau, wie unter 2.1.7. beschrieben, durchgeführt. Der Überstand des Pepsinabbaus wird mit festem NaCl auf 4 % NaCl (w/v) gebracht und 12 Std. bei 4 °C gerührt. Das Präcipitat wird sofort 1o Min. bei 5o.ooo x g abzentrifugiert. Der Überstand wird mit 1 M NaOH auf pH 7,4 gebracht und 36 Std. gegen das 1ooo-fache Volumen 1o mM Tris-HCl, 2o mM NaCl, 2 M Harnstoff, pH 8,6 dialysiert. Das während der Dialyse gebildete Präcipitat wird 1o Min. bei 5o.ooo x g abzentrifugiert, in Elektrophoresepuffer aufgenommen und nach 2.2.6. und 2.2.7. analysiert.

2.1.13. Herstellung von unspezifisch gereinigten Antikörpern gegenTyp IV Kollagen

Eine Ziege wurde mit Typ IV Kollagen, das aus dem Säureextrakt eines Maustumors nach Timpl et al. (64) gereinigt worden war, immunisiert.

Antikörper wurden nach folgendem Schema aus dem Ziegenserum unspezifisch angereichert: Durch eine 3o%ige Ammoniumsulfatfällung wird Immunglobulin (Ig) aus dem Serum präcipitiert. Das Präcipitat wird in 75 mM NaCl, 1oo mM Borsäure, 25 mM $Na_2B_4O_7$, pH 8,5 gelöst und über eine Säule mit Typ I Kollagen-Sepharose 4B (im Labor hergestellt), die mit dem gleichen Puffer äquilibriert ist, gegeben. Eventuell verunreinigende Antikörper gegen Typ I Kollagen sollten an die Säule binden. Der Durchlauf wird in gleicher Weise über eine Typ III Kollagen Affinitätssäule (im Labor hergestellt) gegeben, um Antikörper gegen Typ III Kollagen abzutrennen. Der Durchlauf dieser Säule wird über Amicon XM 3o Filter auf das Volumen des Ausgangsserums eingeengt und als unspezifisch angereicherter Antikörper gegen Typ IV Kollagen verwendet.

2.1.14. Herstellung des Substrates zur Bestimmung der Prolinhydroxylase nach Risteli et al. (65)

Unhydroxylierte Kollagenketten als Substrat für die Bestimmung der Prolinhydroxylase werden aus den Sehnen der Beine von 17 Tage alten Hühnchenembryonen gewonnen. Die Sehnen von 5o Embryonen werden in auf 37°C vorgewärmter Krebslösung (15,6 mM Na_2HPO_4; 1,6 mM KH_2PO_4; 111,2 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 1,3 mM $MgCl_2$; 4 mM $NaHCO_3$: 13 mM Glucose) präpariert. Wichtig ist, daß die gesamte Präparation nicht länger als 6o Min. dauert. Die Sehnenzellen werden mit Kollagenase und Trypsin desintegriert, indem sie in folgende Lösung überführt und 45 Min. bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert werden: 15 ml Krebslösung mit 5mM $CaCl_2$, 3ooo E Kollagenase Typ I aus Clostridium histolyticum (Whatman, München), o,25% Trypsin. Nach der Desintegration wird die Zellsuspension durch eine Lage Linsenpapier filtriert, um Gewebereste

zu entfernen (Swinnexfilter, Millipore,). Die Zellen werden 3 Min. bei 3oo x g abzentrifugiert und 3 x mit je 3o ml Krebslösung, die 1o% fötales Kälberserum (Seromed, München) enthält, gewaschen und schließlich in 1o ml Krebslösung aufgenommen. o,3 mM α,α'-Dipyridyl werden zugegeben, um die Hydroxylierung der Kollagenketten während der Synthese zu verhindern. Es wird in Gegenwart des Eisenkomplexors 3o Min. bei 37°C vorinkubiert, dann o,5 mCi der radioaktiven Aminosäure 4- ^{3}H -Prolin zugegeben und 4 Std. weiterinkubiert. Die Zellen werden 1o Min. bei 12oo x g abzentrifugiert und in 1o ml o,1 M Essigsäure, 1 mM EDTA und 1 mg Trypsininhibitor aus Sojabohnen (Serva, Heidelberg) resuspendiert und mit einem Potter homogenisiert. Das Homogenat wird 16 Std. gegen das 1ooo-fache Volumen o,1 M Essigsäure dialysiert und dann 3o Min. bei 2o.ooo x g abzentrifugiert. Der Überstand wird gegen das 2ooo-fache Volumen 5o mM Tris-HCL, 2oo mM NaCl, pH 7,4 dialysiert. Das Dialysat wird als Substrat für die Bestimmung der Prolinhydroxylase verwendet. Eine gute Präparation sollte zwischen 1o und $2ox1o^{6}$ cpm/ml an Radioaktivität enthalten. Bei -7o°C ist das Substrat für 6 Mon. stabil.

2.1.15. Herstellung des Substrates zur Bestimmung der Lysinoxidase nach Siegel (66)

Fibrilläres Kollagen als Substrat zur Bestimmung der Lysinoxidase wird aus Scheitelbeinen von 17 Tage alten Hühnchenembryonen gewonnen. 2o Paar Scheitelbeine werden präpariert. Je 1o Paar werden in einen sterilen Erlenmeyerkolben von 15o ml Volumen im folgenden sterilen Medium inkubiert: 15 ml MEM Dulbecco ohne Lysin (Seromed, München), o,6 mg Prolin, o,75 mg Glycin,

0,75 mg Ascorbinsäure, 3ooo E Penecillin. In diesem Medium wird 3o Min. bei 37°C vorinkubiert, um noch freies Lysin aus dem Gewebe zu entfernen. Das Medium wird gegen frisches ausgetauscht, dann werden 3oo µCi D, L- 6-^{3}H -Lysin dazugegeben. Die Scheitelbeine werden 24 Std. in Gegenwart des radioaktiven Lysins bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Markierung werden alle Scheitelbeine in 2o ml 5o mM Tris-HCL, 1 M NaCl, pH 7,4 überführt und in einem Homogenisator (Virtis, Minisota, USA) 3o Min. bei 7ooo x g auf Eis homogenisiert. Die Homogenisation sollte alle 5 Min. für 2 Min. unterbrochen werden, damit die Temperatur des Homogenates nicht zu sehr steigt. Das Homogenat wird 3o Min. bei 2o.ooo x g abzentrifugiert. Der Überstand wird mit 2o % festem NaCl versetzt und 12 Std. langsam gerührt. Das gebildete Präcipitat wird 1o Min. bei 5o.ooo x g abzentrifugiert. Das Pellet wird in 1o ml phosphatgepufferter physiologischer Salzlösung (PBS) resuspendiert und 36 Std. gegen das 1ooo-fache Volumen PBS dialysiert. Das Dialysat wird als Substrat für die Lysinoxidasebestimmung verwendet. Ein gutes Substrat sollte zwischen 3 und 5x1o^{6} cpm/ml an Radioaktivität eingebaut haben. Bei -7o°C gelagert ist das Substrat ca. 8 Wochen verwendbar. Unmittelbar vor dem Einsetzen in den Enzymtest wird das Substrat 6o min bei 37°C inkubiert, um eine Renaturierung der Kollagenfibrillen zu bewirken.

2.2. Analytische Methoden

2.2.1. Zählung von Zellen in Suspension

Alle beschriebenen Zellzählungen von Zellen in Suspension werden in einer Erythrozytenzählkammer (NEUBAUER-Zählkammer) durchgeführt.

2.2.2. Zählung von adhärenten Zellen in der Kulturflasche

Zellen in der Kulturflasche können nur nach einem Mediumwechsel, wobei nicht adhärentes Material weggewaschen wird, mit Hilfe eines Umkehrmikroskops gezählt werden. Um einen Überblick über die gesamte Kulturflasche zu erhalten, wird ein Gitternetz mit Gitterquadraten von 1 x 1 mm Größe unter die Flasche gelegt. Statistisch über den ganzen Flaschenboden verteilt werden die adherenten Zellen in verschiedenen Quadraten ausgezählt und auf die Gesamtfläche hochgerechnet.

2.2.3. Bestimmung des Zellwachstums durch Einbau von ^{3}H -Thymidin in die DNA (67)

Es werden mehrere Zellkulturen in Flaschen mit 25 cm^2 Bodenfläche parallel angelegt. Nach 45 Std. wird unter 2x igem Waschen der angehefteten Zellen das Medium gewechselt. Das neue Medium wird mit 25 µCi/ml ^{3}H -Thymidin versetzt. Alle 24 Std. werden die Zellen einer Flasche unter Verwerfen des Mediums durch Abkratzen mit einem Teflonspatel in phosphatgepufferter physiologischer Salzlösung geerntet. Die Zellen werden in einem Potter homogenisiert und die Zelltrümmer 1o Min. bei 1o.ooo x g abzentrifu-

giert. Das Pellet wird zur DNA-Extraktion (68) in 3ml 1M NaCl aufgenommen. 3ml kaltes wassergesättigtes Phenol wird zugegeben und 3o Min. langsam geschüttelt. Zur Phasentrennung wird 5 Min. bei 5.ooo x g zentrifugiert und die Oberphase abgezogen. Die Phenolextraktion wird 1 x wiederholt und die beiden DNA enthaltenden Phasen vereinigt. In einem 5oo µl Aliquot wird die Radioaktivität gemessen.

2.2.4. Gradientengelelektrophorese zur Trennung von Kollagen-Ketten modifiziert nach Laemmli (69)

Es werden 3 verschiedene Gellösungen mit 4,5 %; 5 % und 1o % Acrylamid benötigt. Zur Herstellung 5 %iger Gele werden 1,9 ml Stammlösung I (4o % Acrylamid, 1,o6 % Methylen-bis-acrylamid in H_2O), 5 ml Stammlösung II (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; o,3 % SDS), o,o2 ml N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED), o,o7 ml 1o %iges Ammoniumperoxodisulfat und 8 ml H_2O gemischt. Zur Herstellung von 1o %igen Gellösungen wird das Volumen der Stammlösung I verdoppelt und entsprechend weniger H_2O zugesetzt. Zur Herstellung von 4,5 %igen Gellösungen wird Stammlösung I entsprechend verringert; außerdem wird an Stelle von Stammlösung II o,5 M Tris-HCl, pH 6,8; o,3 % SDS verwendet.

Aus 5 und 1o %iger Gellösung wird mit Hilfe eines Gradientenmischers von unten nach oben in 2 Kammern von je 11 x 1o,8 x o,1 cm (Elektrophoreseapparatur Fa. Desaga, Heidelberg) je ein kontinuierlicher Gradient gepumpt. Der Gradient wird mit Wasser überschichtet und 3o Min. zum Polimerisieren stehengelassen. Das Wasser wird abgegossen und der Gradient mit dem 4,5 %igen Gel überschichtet, in das sofort der Kamm zur Herstellung der Pro-

bentaschen eingesetzt wird. Nach weiteren 6o Min. Polimerisation kann der Kamm gezogen und das Gel verwendet werden.
Die zu analysierenden Proben werden, bei lyophylisierten und präcipitierten Proben, in folgendem Probenpuffer aufgenommen bzw. bei flüssigen Proben mit dem gleichen Volumen an Probenpuffer versetzt: 65 mM Tris, 2 % SDS, 7,5 % Glycerin, o,1 % Bromphenolblau, pH 8,6. Gegebenenfalls wird zum Reduzieren der Proben 5 µl einer 5o mM Dithioerytritlösung pro 2o µl Probenvolumen zugegeben. Alle Proben werden, wenn nicht anders angegeben, 3o Min. bei 5o°C inkubiert und anschließend in die Taschen der Plattengele einpipettiert. Die Elektrophorese wird in folgendem Laufpuffer mit einer Spannung von 1oo Volt durchgeführt, bis die Bromphenolblaubande das Trenngel erreicht hat: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, o,1 % SDS, pH 8,3. Dann wird die Spannung auf 2oo Volt erhöht.

2.2.5. Analyse von elektrophoretisch getrennten radioaktiv markierten Proteinen durch Fluorographie nach Bonner und Laskey (7o)

Die nach 2.2.4. bzw. 2.2.6. hergestellten Plattengele werden mit folgender Färbelösung proteingefärbt: 2o%ige Trichloressigsäurelösung mit o,5 g/l Coomassie Brilliant Blue R 25o (Serva, Heidelberg). Anschließend wird mit 7 %iger Essigsäure entfärbt und die Gele zur Dokumentation der Markerproteine fotographiert.
Die entfärbten Gele werden 2 x 2 Std. in je 5oo ml Dimethylsulfoxid entwässert. Danach werden sie für weitere 2 Stunden in 12o ml Dimethysulfoxid, in dem 3o g 2,5Diphenyloxazol gelöst

wurden, inkubiert und zuletzt 1 Std. in 5 l destilliertem Wasser fixiert. Die Gele werden auf Filterpapier getrocknet und 2 bis 6 Wochen, je nach Radioaktivität, auf Röntgenfilm ILFORD Rapid R, Type S bei -7o°C inkubiert. Die entwickelten Röntgenfilme zeigen die radioaktiven Proteinbanden, die mit den Coomassie Brilliant Blue gefärbten Banden verglichen werden.

2.2.6. Plattengelelektrophorese zur Trennung stark aggregierender Proteine (71,72)

Für diese Elektrophorese wird, da sie ohne Sammelgel durchgeführt wird, lediglich eine Gellösung mit 3,5 % Acrylamid benötigt. Diese Gellösung wird entsprechend der unter 2.2.4. beschriebenen Vorschrift hergestellt, dem Gelpuffer wird jedoch 2 % SDS anstelle von o,3 % zugesetzt, um die Aggregation der aufgetragenen Proteine herabzusetzen. Dem Elektrophoreselaufpuffer wird 1 % SDS anstelle von o,1 % (s. 2.2.4.) zugesetzt. Die gesamte Elektrophorese wird mit einer Spannung von 1oo Volt durchgeführt.

2.2.7. Densitometrie

Alle densitometrischen Analysen wurden mit dem automatischen Komputerdensitometer ACD-18 der Firma Gelman Instrument Company, München, durchgeführt. Röntgenfilme (s. 2.2.5.) werden mit einer Wellenlänge von 55o nm gescannt.

2.2.8. Immunpräcipitation von Bindegewebsproteinen aus Medien und Zellextrakten nach Mosher et al. (73)

Immunpräcipitationen wurden ausgeführt mit Antikörpern gegen Humanplasma-Fibronektin von der Ziege (Behringwerke, Marburg) sowie mit Antikörpern gegen Typ IV Kollagen von der Ziege, die im Labor hergestellt wurden (s. 2.1.13).
Durchführung: Eine 5o µg Protein enthaltende Menge Medium bzw. Zellextrakt wird mit dem gleichen Volumen der jeweiligen Antikörpersuspension versetzt und 2 Std. bei 22°C unter Schütteln inkubiert. Zur Präcipitation der Antigen-Antikörper-Komplexe wird nochmals das gleiche Volumen an Anti-Ziegen- Globulin vom Kaninchen zugegeben (Bestimmung der Anti- Globulin Verdünnung (s. 2.2.9.) und 12 Std. bei 4°C ohne Schütteln weiterinkubiert. Das Präcipitat wird 5 Min. bei 1o.ooo x g abzentrifugiert und 3 x mit phosphatgepufferter physiologischer Salzlösung, die 1 % Rinderserumalbumin enthält, gewaschen. Das Präcipitat wird in 3o µl Elektrophoresepuffer mit 1oo mM DTE und 8 M Harnstoff aufgenommen und durch Gradientengelelektrophorese mit anschließender Fluorographie analysiert (s. 2.2.4. und 2.2.5.).

2.2.9. Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony (74)

1 % Agarose wird in 5o mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4, durch Erhitzen im 1oo°C Wasserbad gelöst. Zur Vermeidung von Bakterienwachstum werden der Agaroselösung o,1 % NaN_3 hinzugesetzt. Anschließend wird die Lösung ca. 2 mm hoch in Petrischalen von 4 cm Durchmesser gegossen und das Gel bei Zimmertemperatur erstarren gelassen. 1 zentrales und 6 periphere Löcher im Abstand von 1,5 cm werden ausgestanzt. Alle Löcher sollen einen Durchmesser von 4 mm

haben. In das zentrale Loch wird das Antigen pipettiert, das möglichst in einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml vorliegen sollte. Der Antikörper wird in einer geometrischen Verdünnungsreihe (1:2, 1:4, 1:16...) in die umgebenden Löcher pipettiert. Antigen und Antikörper werden ca. 48 Std. in einer feuchten Kammer diffundieren gelassen. Tritt eine Immunreaktion auf, bildet sich ein weißes Präcipitat. Für die Immunpräcipitationen (s.2.2.8.) wird ein Antikörpertiter verwendet, der zwei Verdünnungsstufen unter der schwächsten Immunreaktion dieses Testes liegt.

2.2.1o. Bestimmung der Prolinhydroxylaseaktivität in der Zellkultur nach Cutroneo et al. (75)

Einen Tag nach Konfluenz der Zellkulturen (s. 2.1.6.) wird das Medium abgegossen und die Zellen in folgendem Puffer vom Boden der Flaschen mit einem Teflonspatel abgekratzt: 2o mM Tris-HCl, 2oo mM NaCl, 1oo mM Glycin, 5o µM DTE, o,1 % (w/v) Triton X-1oo, pH 7,5. Die Zellen werden im Potter homogenisiert und die Zelltrümmer 1o Min. bei 2o.ooo x g abzentrifugiert. Die Prolinhydroxylaseaktivität ist im Überstand lokalisiert.
Parallel dazu wird ein Aliquot des Mediums 12 Std. gegen das 5oo-fache Volumen des o.g. Homogenisationspuffers dialysiert. Im Dialysat wird ebenfalls die Aktivität der Prolinhydroxylase bestimmt. Die Enzymaktivität wird an Hand des bei der enzymatischen Reaktion abgespaltenen Wassers, das auf Grund des radioaktiv markierten Substrates (s. 2.1.14.) in Form von Tritium HO vorliegt, gemessen.

Für den Enzymtest, der stets als Dreifachbestimmung durchgeführt wird, werden für jeden Testansatz folgende Reagenzien zusammenpipettiert: 2oo µl 1,13 mM Eisenammoniumsulfat, 1oo µl 1o mM α-Ketoglutarat, 1oo.ooo cpm des nach 2.1.11.präparierten Substrates, ca. 1 mg Enzymprotein und H_2O zu einem Gesamtvolumen von 1,5 ml. Die Proben werden 3 Std. bei 37°C inkubiert. Der Test wird durch Zugabe von 15o µl 5o %iger Trichloressigsäure gestoppt,und die Proben werden für 15 Min. auf Eis gestellt. Ausgefälltes Protein wird dann 2o Min. bei 7.ooo x g abzentrifugiert. o,9 ml des Überstandes werden auf jeweils eine o,5 x 2 cm große Säule mit einem Kationenaustauscherharz (Dowex 5o W-X8, Serva, Heidelberg), äquilibriert mit 5 %iger Trichloressigsäure, gegeben. Der Durchlauf wird gesammelt, und mit o,6 ml 5 %iger Trichloressigsäure eluiert. Durchlauf und Eluat werden vereinigt und in 7,5 ml davon wird die Radioaktivität gemessen. Die Aktivität der Prolinhydroxylase wird in cpm/mg Enzymprotein ausgedrückt.

2.2.11. Bestimmung der Lysinoxidaseaktivität in der Zellkultur nach Melet et al. (75)

Zur Bestimmung der Lysinoxidaseaktivität im Kulturmedium wird ein Aliquot des Mediums 12 Std. gegen das 5oo-fache Volumen o,15 M NaCl, o,1 M Na_2HPO_4, pH 7,8 (PBS) dialysiert (66). Ungefähr $3x1o^6$ Zellen werden in 1 ml 6 M Harnstoff, 5o mM Tris-HCL, pH 7,2 mit einem Teflonspatel abgekratzt und im Potter homogenisiert. Das Homogenat wird 1o Min. bei 2o.ooo x g abzentrifugiert.

Das Pellet wird in o,5 ml Puffer rehomogenisiert und abzentrifugiert. Die beiden Überstände werden vereinigt und 3o Min. gegen PBS dialysiert. Zur Dialyse (77) werden Membranfilter mit der Porengröße 5o nm verwendet (Millipore VMWP).

Zur Bestimmung der Lysinoxidaseaktivität, die auf dem gleichen Prinzip beruht wie die Bestimmung der Prolinhydroxylase, werden zu einer Menge fibrillären Kollagensubstrates mit 3oo.ooo cpm ca. o,5 bis 1 mg Enzymprotein, vorgewärmt auf 37°C, gegeben. Das Volumen des Testansatzes wird gegebenenfalls mit vorgewärmtem PBS auf 1,5 ml aufgefüllt. Die Proben werden 3 Std. in einem Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Enzymkontrollen werden in Gegenwart von 5o µg/ml ß-Aminopropionitrilfumarat, das die Enzymaktivität in dieser Konzentration 1oo %ig hemmt, durchgeführt. Die Inkubation wird mit 15o µl 5o %iger Trichrolessigsäure gestoppt. Alle weiteren Schritte werden, genau wie für die Bestimmung der Prolinhydroxylase unter 2.2.1o. beschrieben, durchgeführt. Die Lysinoxidaseaktivität wird ebenfalls in cpm/mg Enzymprotein ausgedrückt.

2.2.11. Proteinbestimmung

Alle Proteinbestimmungen, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben sind, wurden nach der Methode von Lowry et al. (78) ausgeführt.

2.2.12. Referenzproteine für die Elektrophorese

Typ I Kollagen aus Babyhaut wurde nach der Methode von Kühn et al. (79) im Labor hergestellt.
Typ V Kollagen gereinigt aus humaner Amnionhaut wurde von Dr. L. Risteli, Universität Oulu, Finnland, zur Verfügung gestellt. Fibronektin aus Humanplasma war eine Gabe von Dr. Schwinn, Behringwerke, Marburg.

2.2.13. Dokumentation der Phasenkontrastmikroskopie von Monolayerzellkulturen

Monolayerkulturen wurden mit einem Phasenkontrastumkehrmikroskop "Invertoskop D" der Firma ZEISS, Frankfurt, ausgerüstet mit einem Photoaufsatz, angesehen und zur Dokumentation fotographiert. Hierzu wurde Agfaortho 25, Professional, Dokumentenfilm verwendet.

2.2.14. Indirekte Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Gerinnungsfaktor VIII (9)

Unmittelbar nach Erreichen der Konfluenz einer Zellkultur wird nach Abgießen des Mediums der Boden der Kulturflasche ausgesägt. Die Zellage wird schnell mit einem kalten Fön getrocknet und kann entweder sofort für die Immunfluoreszenz verwendet oder bei -7o°C gelagert werden. o,5 cm^2 der Zellage werden mit ca. 2o µl Antiserum gegen Gerinnungsfaktor VIII vom Kaninchen (Behring-Werke, Marburg) überschichtet und für 3o Min. in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wird 3o Min. in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung, pH 7,4, (PBS) gewaschen. Dann werden die Zellen mit ca. 3o µl

Fluorescin-gekoppeltem anti-Kaninchen γ-Globulin von der Ziege (Behring-Werke, Marburg) überschichtet und nochmals 3o Min. in der feuchten Kammer inkubiert. Danach wird 6o Min. mit PBS gewaschen und mit gepuffertem Glycerin eingedeckt (PBS: Glycerin, 1 : 1o). Es werden 2 Kontrollen durchgeführt: Anstelle des Antikörpers wird mit PBS bzw. mit Immunglobulin vom Kaninchen (2o µg/ml, im Labor hergestellt) überschichtet.
Die Reaktion der Zellen wird innerhalb von 24 Std. mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

3. ERGEBNISSE

Teil I : Etablierung eines Tiermodells

In diesem ersten Teil der Arbeit wird die Isolierung von zwei verschiedenen Zellarten aus dem Lebergewebeverband, die Kultivierung dieser Zellen und ihre morphologische Beschreibung mit Hilfe von Phasenkontrast- und Elektronenmikroskopie in der Monolayerkultur gezeigt werden. Die Fähigkeit dieser Zellen in der Primärkultur zur Biosynthese von Kollagenen und Glykoproteinen wird qualitativ und quantitativ beschrieben werden. Alle diese Versuche wurden mit Lebern von neugeborenen Affen der Art Macaca fascicularis durchgeführt. Dabei wurden - nach Etablierung des grundsätzlichen Versuchsablaufes mit größeren Mengen von Gewebematerial - alle Arbeitsgänge ausgehend von 5g (Naßgewicht) Lebergewebe durchgeführt, um sicherzustellen, daß spätere Experimente mit humanen Keilbiopsien von maximal 5g Naßgewicht rein technisch ausführbar sind und somit Aussicht auf ein aussagekräftiges Ergebnis haben.

3.1. Isolierung von zwei nicht parenchymatischen Zellfraktionen aus Lebern von neugeborenen Affen

3.1.1. Vorbereitung der Leberzellen für die Dichtegradientenzentrifugation

Bei der Desintegration und Vorbereitung der Zellen für die Dichtegradientenzentrifugation nach 2.1.1. konnte bereits eine erste grobe Trennung der Zellen durch die 5 min Sedimentation (58) erreicht werden. Im Sediment befand sich neben nicht vollstän-

dig desintegrierten Zellklümpchen auch eine relativ große Menge in der Zählkammer gut zählbare vereinzelte Zellen, die ca. 4o bis 45 % der Gesamtmenge der desintegrierten Zellen ausmachte. Diese Zellen wurden in Kultur gebracht (s. 2.1.6.) und mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie untersucht (Abb. 3). Alle nach drei Tagen adhärenten Zellen konnten nach morphologischen Kriterien als Parenchymzellen identifiziert werden.

3.1.2. Trennung verschiedener Zelltypen über Dichtegradientenzentrifugation

Zur Dichtegradientenzentrifugation der Leberzellen wurde das synthetische Gradientenmedium PERCOLL (Pharmacia, Uppsala) verwendet. Es handelt sich hierbei um ein kolloidales Kieselgel, was schon früher mit Erfolg in der Dichtegradientenzentrifugation zur Trennung von ganzen Zellen eingesetzt wurde (8o). Percoll ist durch Ummantelung des Kieselgels mit Polyvinylpyrrolidin chemisch vollkommen inert und sollte daher zur Trennung von Zellen, die anschließend in Kultur genommen werden sollen, noch besser geeignet sein (81,82). Schwierigkeiten bei der Kultur der Zellen, die auf osmotische Probleme zurückzuführen sind, können bei der Verwendung von Percoll vermieden werden, da die Percoll-Lösung auf Grund ihrer geringen Osmolarität (2o m Os/kg H_2O) exakt auf die Bedingungen des späteren Kulturmediums eingestellt werden kann (s. 2.1.5.).

Zur Standardisierung der beschriebenen Zelltrennungsmethode wurde zunächst ein linearer Gradient von 1o % (w/w) bis 9o % Percoll ausgetestet, der schließlich nach dem sichtbaren Bandenmuster auf einen Gradienten von 1o bis 6o % Percoll eingegrenzt

Abb. 3

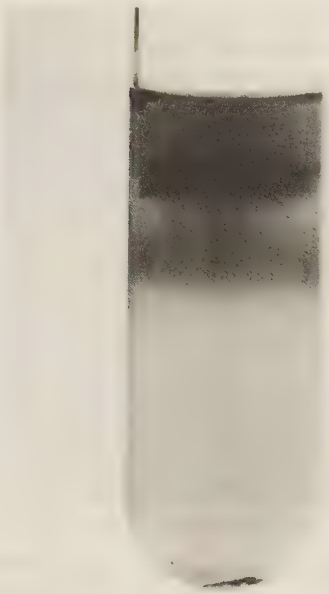
Primärkultur von Parenchymzellen aus Affenleber

Nach 60 Min. Desintegration der Leberstückchen mit Kollagenase (s. 2.1.1.) wurde die Zellsuspension 5 Min. sedimentiert (58). Die vereinzelten Zellen des Sedimentes wurden in Kultur gebracht (s. 2.1.6.).
Die Abbildung stellt eine phasenkontrastmikroskopische Aufnahme der adherenten Zellen dieser Kultur zwei Tage nach dem ersten Mediumwechsel dar (s. 2.1.6.).
Vergrößerung 160 x

werden konnte (Abb. 4). Die beste Auftrennung der Zellen in einzelne Banden konnte erreicht werden, wenn zwischen 25 und $35x1o^6$ Zellen auf einen Gradienten von 3o ml Gesamtvolumen aufgetragen wurden. Die aufgetragene Zellsuspension sollte nicht mehr als $5x1o^6$ Zellen/ml enthalten, da die Zellen sonst stark aggregieren und keine gute Trennung mehr möglich ist.
Da auf Grund der zu erwartenden sehr geringen Mengen einzelner Zelltypen (83) nicht allein nach dem sichtbaren Bandenmuster gearbeitet werden konnte, wurde ein Gradient kontinuierlich in 9 Fraktionen aufgeteilt, alle Fraktionen in Primärkultur gebracht und mit Hilfe von Phasenkontrastmikroskopie untersucht (Tab. 1). Wie aus Tab. 1 hervorgeht, wurden 2 Fraktionen gefunden, die jeweils überwiegend einen Zelltyp enthielten. Die oberste, auch optisch deutlich erkennbare Bande enthielt reproduzierbar eine nach morphologischen Kriterien zu 9o bis 1oo % reine Zellfraktion und wurde im Gradienten im Bereich von 15 bis 2o % Percoll gefunden. Im Bereich von 4o bis 47 % Percoll wurde ein zweiter Zelltyp identifiziert, der jedoch im Gradienten optisch nur sehr schlecht als Bande erkennbar war (Abb. 4). Diese Zellfraktion bestand zu 8o bis 9o % aus einem Zelltyp und war zu 1o bis 2o % mit einem zweiten Zelltyp verunreinigt.
Für alle weiteren Experimente wurden lediglich diese beiden weitestgehend gereinigten Zellfraktionen verwendet.
Die quantitativen Verhältnisse der Zelltrennung vor der Kultivierung sind ebenfalls in Tab. 1 wiedergegeben. Nach Standardisierung der Zelltrennung wurden in 6 Versuchsansätzen, in denen jeweils ca. $3ox1o^6$ Zellen auf einen Dichtegradienten aufgetragen

Abb.4

Trennung von Affenleberzellen durch Dichtegradienten-zentrifugation



$30x10^6$ Affenleberzellen wurden auf einen Gradienten von 10 bis 60% Percoll aufgetragen und 30 Min. bei 1500 x g zentrifugiert und fotographiert. Für diesen Versuch wurde Medium ohne ph-Indikator Phenolrot verwendet, um besser sichtbare Banden zu erzielen.Die Pfeile zeigen die Lage der zwei Banden an, die vorwiegend einen Zelltyp enthalten (vergl. Tab.1). Im typischen Verlauf der Trennung konnte die untere Bande optisch nicht, bzw. sehr schlecht ausgemacht werden.

Tab. 1

FRAKTIONIERUNG EINES DICHTEGRADIENTEN

Fraktionsnr.	Beschreibung der Fraktion im Gradienten	Anzahl der in der Primärkultur gefundenen Zellarten	Zellzahl vor Kultur	Anteil der Zellen an der aufgetragenen Gesamtzellzahl in %
1	Auftragsvolumen (kein Percoll)	nicht angew.	$0,3x10^6$	1
2	10-15% Percoll	2	$1,1x10^6$	3,7
3	15-20% Percoll	1	$7,3x10^6$	24,3
4	20-24% Percoll	nicht angew.	$0,4x10^6$	1,3
5	24-32% Percoll	5	$8,8x10^6$	29,3
6	32-40% Percoll	3	$0,9x10^6$	3
7	40-47% Percoll	1	$2,3x10^6$	7,7
8	47-55% Percoll	Erythrozyten	-	-
9	Pellet	Parenchymz.	$11,7x10^6$	39

wurden, die Zellen im Bereich von 15 bis 2o % Percoll, die Zellen im Bereich von 4o bis 47 % Percoll sowie die Zellen des Pellets in der Zählkammer gezählt (s. 2.2.1.). Im Mittel wurden 25 % der aufgetragenen Zellen in der oberen Bande gefunden, 6 bis 9 % der Zellen in der unteren und 35 % der Zellen im Pellet.

3.2. Morphologische Beschreibung der durch Dichtegradientenzentrifugation isolierten Zellfraktionen

3.2.1. Erste Differenzierung durch Phasenkontrastmikroskopie

Die phasenkontrastmikroskopischen Auswertungen zur endgültigen Typeneinteilung der zwei durch Gradientenzentrifugation isolierten Zellfraktionen, wurden in fast konfluenten oder konfluenten Zellkulturen durchgeführt. Auf diese Weise konnte ein wichtiges morphologisches Merkmal, die Ausprägung von Zellkontakten, in die Untersuchung einbezogen werden.

Die im oberen, weniger dichten Bereich des Gradienten isolierte Zellfraktion zeigte in der Kultur eine polygonale Form mit großflächigen, unregelmäßigen cytoplasmatischen Ausläufern (Abb. 5) und breiten,gelappten Zellkontakten. Bei zunehmender Zelldichte in der Kultur veränderte sich die Form der Zellen zu einer mehr langgestreckten, die die ungleichmäßigen Ausläufer nur noch an den schmalen Enden besaß (Abb. 6a). Das Cytoplasma der Zellen erschien stark granuliert. Diese Granulation sowie die Form der Zellen in der stark konfluenten Kultur, erinnerte an die der häufig kultivierten und beschriebenen Fibroblasten oder auch an

Abb.5

Primärkultur von Myofibroblasten aus Affenleber

Die nach 2.1.1. desintegrierten Affenleberzellen wurden durch Dichtegradientenzentrifugation (s. 2.1.5.) fraktioniert und, wie unter 2.1.6. beschrieben, in Primärkultur genommen.
Die Abbildung zeigt eine Kultur der Zellen aus der in Abb.4 dargestellten oberen Bande des Gradienten etwa 2 Tage vor Konfluenz.
Vergrößerung 160 x

die den Fibroblasten nicht unähnlichen glatten Muskelzellen. Zum Vergleich wurden Hautfibroblasten, ausgewachsen aus kleinen Hautstückchen (s. 2.1.2.) sowie glatte Muskelzellen aus Aorta (s. 2.1.3.) in Primärkultur gebracht. Im Unterschied zu den aus Affenleber isolierten Zellen waren in keiner der beiden Vergleichszellarten die großflächigen Ausläufer mit den breiten, gelappten Zellkontakten sichtbar. Die glatten Muskelzellen zeigten darüberhinaus ein weniger stark granuliertes Cytoplasma als die Affenleberzellen (Abb. 6). Trotz dieser phasenkontrastmikroskopisch nur geringen Ähnlichkeiten wurden die in der oberen Bande des Dichtegradienten isolierten Zellen "Myofibroblasten" genannt. Dieser Arbeitsname wird der Einfachheit halber bereits an dieser Stelle eingeführt, obwohl dieser Name erst durch die ultrastrukturellen Untersuchungen, die im nächsten Kapitel beschrieben sind, verständlich wird (s. auch 5.1.).

In der zweiten Affenleberzellfraktion, in einem dichteren Bereich des Gradienten bandierend, waren kleinere, wesentlich gleichmäßigere spindelförmige Zellen sichtbar (Abb. 7a). Auch diese Zellen hatten breite, allerdings sehr glatte Zellkontakte, die sie durch alle Kulturstadien hindurch behielten. Der relative Anteil des Cytoplasmas zum Kern war bei diesen Zellen deutlich kleiner als bei den Myofibroblasten. Er erschien klar und wenig granuliert.

Das Bild dieser Zellen in Kultur war sehr gut mit den zum Vergleich isolierten Gefäßendothelzellen aus der Vena cava (s. 2.1.4.) zu vereinbaren (Abb. 7b), so daß zunächst angenommen wurde, daß es sich bei der isolierten Fraktion um Gefäßendothelzellen

Abb.6

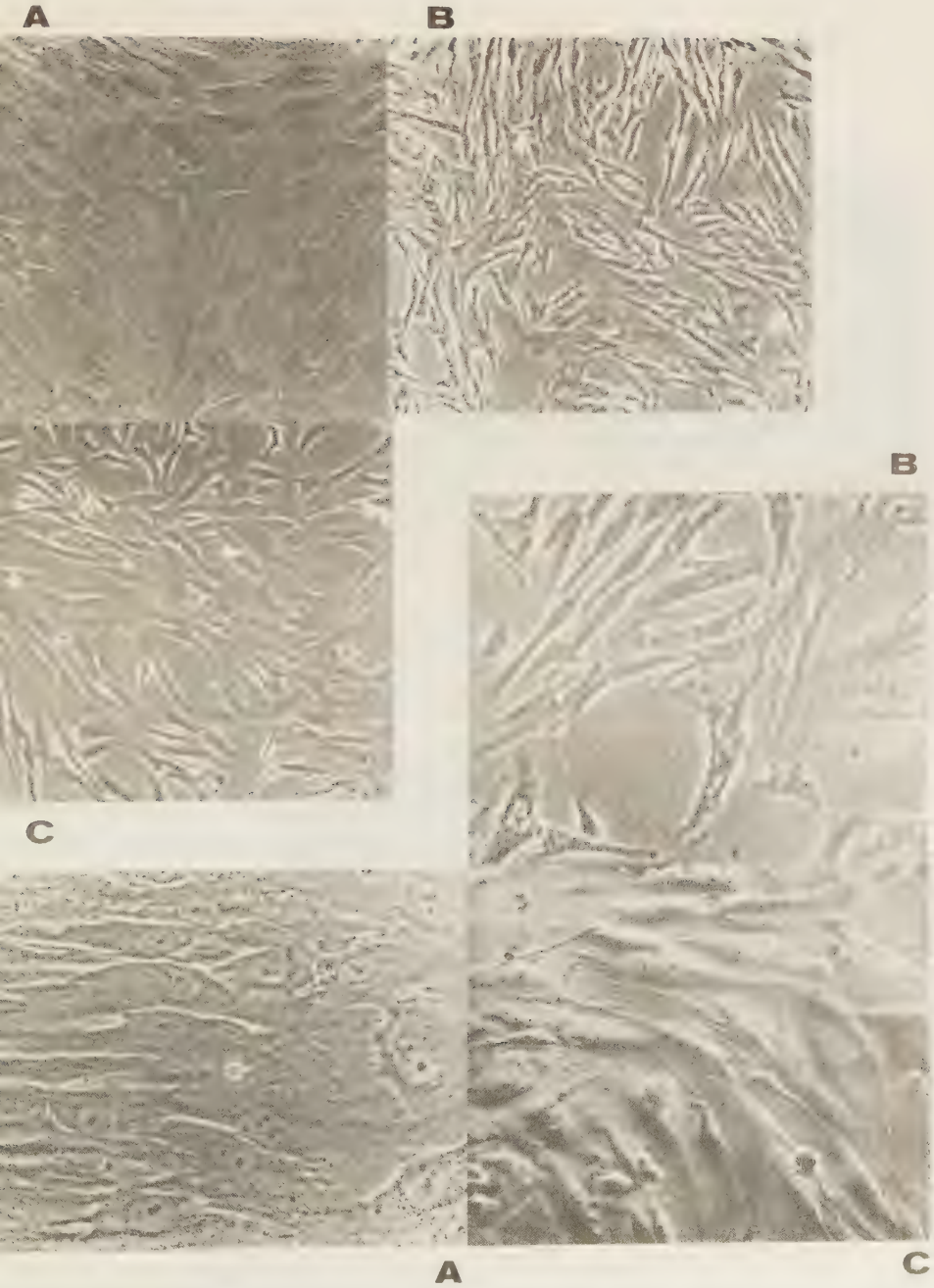


Abb.6

Primärkultur von Myofibroblasten im Vergleich mit Hautfibroblasten und glatten Muskelzellen

---

A: Durch Dichtegradientenzentrifugation gereinigte Myofibroblasten aus Affenleber in dicht konfluenter Primärkultur (vergl. Abb.5).
⟶: breite, unregelmäßig gelappte Zellkontakte.

B: Hautfibroblasten ausgewachsen aus Haut von neugeborenen Affen in Primärkultur kurz vor Konfluenz (s. 2.1.2.).
⟶: keine breiten Zellkontakte, sondern Berührung der Zellen durch schmale, spitz zulaufende cytoplasmatische Ausläufer.

C: Glatte Muskelzellen aus Aorten neugeborener Affen in konfluenter Primärkultur (s. 2.1.3.).
⟶: Zellkontakte z.T. breit, jedoch völlig glatt, z.T. durch lange,schmale Ausläufer.

oben: Vergrößerung 40 x
unten: Vergrößerung 160 x

Abb.7

Primärkultur von endothelialen Zellen aus Affenleber

A: Dicht konfluente Kulturen der Affenleberzellen aus der unteren Bande des in Abb.4 dargestellten Gradienten.
Vergrößerung 125 x

B: Dicht konfluente Kultur von Gefäßendothelzellen aus Vena cava von neugeborenen Affen (s. 2.1.4.) zum Vergleich.
Vergrößerung 125 x

Abb.7

handelt. Die Kontrolle dieser Zellkulturen durch Immunfluoreszenz mit anti-Faktor VIII (s.2.2.14) war jedoch strikt negativ. Obligates Merkmal für Gefäßendothelzellen ist der Nachweis von Faktor VIII. Auf Grund ihrer nach phasenkontrastmikroskopischen Gesichtspunkten hohen Ähnlichkeit mit Gefäßendothelzellen, jedoch der eindeutigen Faktor VIII Negativität, erhielten die in dieser Fraktion isolierten Zellen den Arbeitsnamen "endotheliale Zellen".

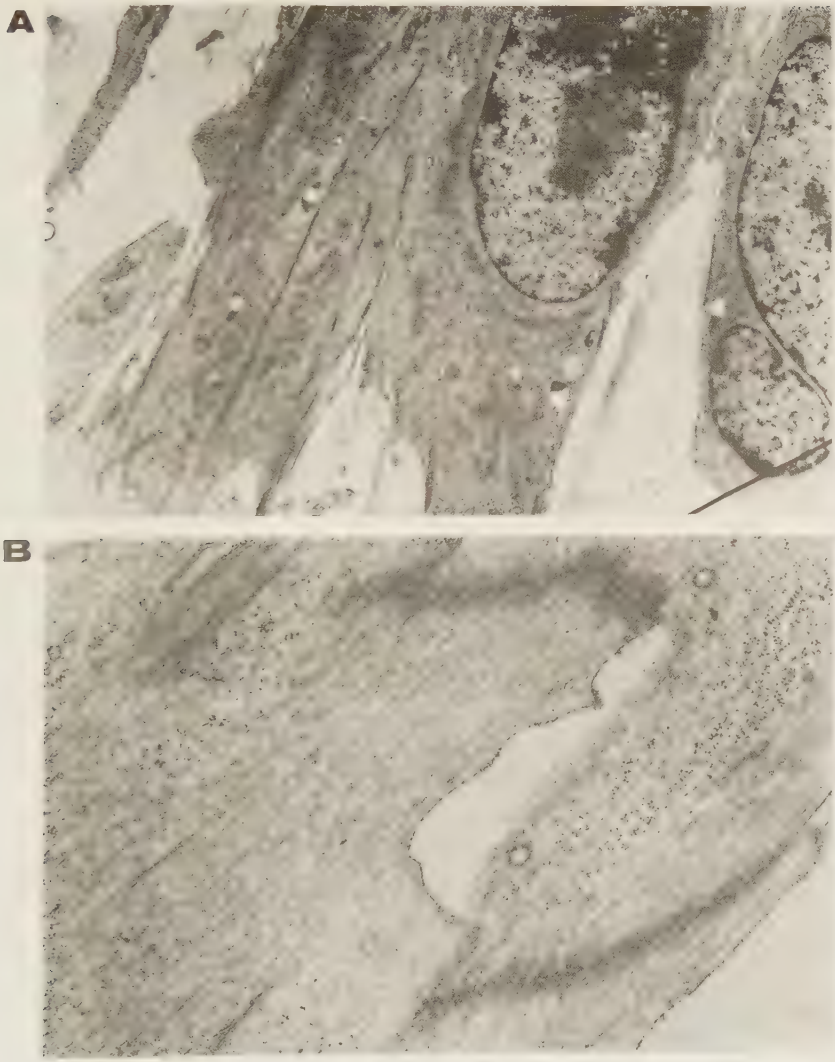
3.2.2. Feinstruktur der Primärkulturzellen

Nach der phasenkontrastmikroskopischen Auswertung der beiden unterschiedlichen Zellfraktionen in der Primärkultur wurden diese in ihren Kulturgefäßen mit einem Gemisch aus 2,5 % Glutaraldehyd und 5 % Formaldehyd in Cacodylatpuffer bei pH 7,4 für 1 Std. fixiert, mit 1 % Osmiumsäure nachfixiert und nach Entwässerung in steigenden Konzentrationen von Alkohol in Epon 812 eingebettet. Bei diesem Verfahren bleibt die ursprüngliche Form und die Nachbarschaftsbeziehung der Zellen untereinander erhalten. Einzelne Kolonien wurden nach lichtmikroskopischer Auswahl aus dem Boden der Kulturgefäße herausgesät und für die Ultradünnschnittechnik zubereitet. So können genau orientierte Schnitte parallel zur Flächenausbreitung der Zellen gewonnen und elektronenmikroskopisch ausgewertet werden.

Die in der oberen Bande des Dichtegradienten isolierten Zellen (Myofibroblasten) stellen sich großflächig, mit breiten unregelmäßigen Zellausläufern versehen dar und besitzen ausgeprägte Verbindungen zu Nachbarzellen in Form von Desmosomenreihen (Abb.8). Von den einzelnen Desmosomen strahlen parallel angeordnete Filamentbündel ins Cytoplasma ab. Dieses enthält neben

Abb.8

Ultrastruktur der Myofibroblasten



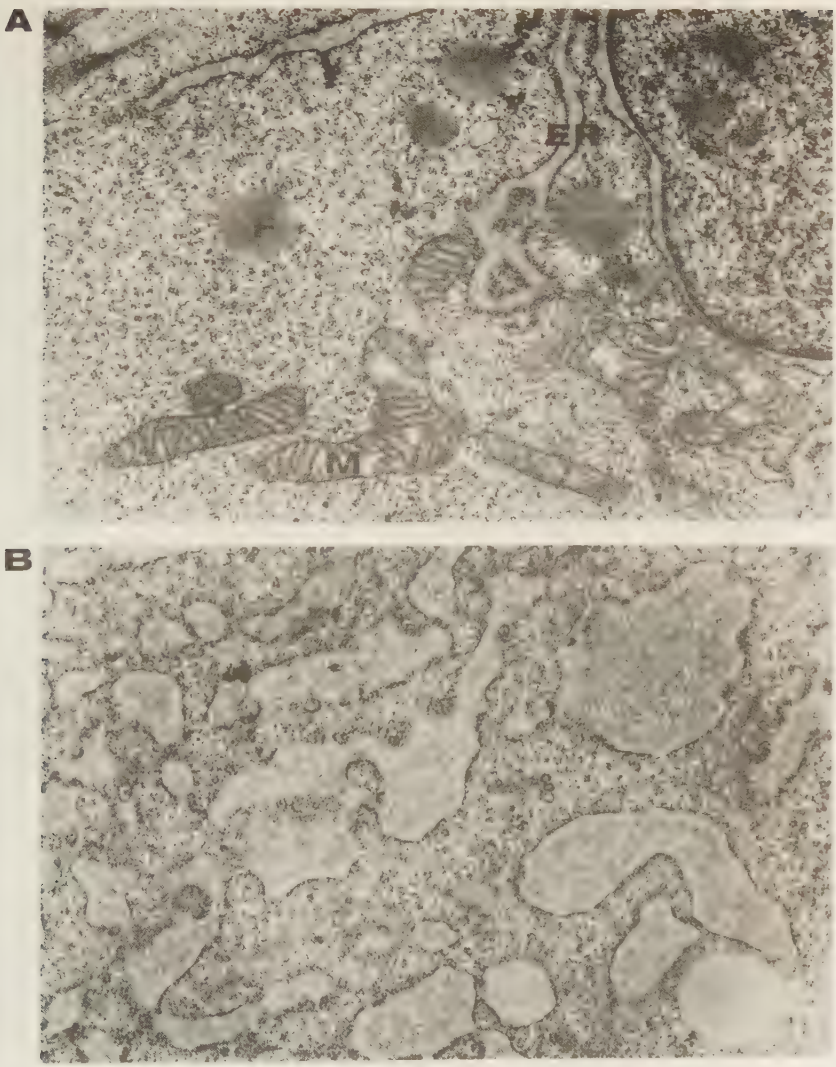
A: Übersicht über einen Myofibroblasten, insbesondere über einen der breiten Zellausläufer. Vergrößerung 9120 x
B: Kontaktzone zwischen zwei Myofibroblasten mit ausgeprägten Desmosomenreihen. Vergrößerung 28842 x

langgestreckten Mitochondrien und einigen Lipidtropfen vorwiegend freie Ribosomen, aber auch einige Elemente des rauhen endoplasmatischen Retikulum, meist in Kernnähe und in Verbindung mit der perinukleären Zisterne (Abb.9a). In einigen Zellen der Kultur wird das rauhe endoplasmatische Retikulum stärker ausgebildet und der zisternale Raum deutlich erweitert gefunden. In seinem Inneren kann feingranuliertes Material von mittlerer Elektronendichte beobachtet werden (Abb.9b).

Beherrschendes Kennzeichen für diese Zellen sind die verschiedenen Arten von cytoplasmatischen Filamenten und Mikrotubuli (Abb. 1oa). Unterhalb der Plasmamembran und vorwiegend in den breiten Zellfortsätzen liegen dicht gepackte Bündel von dünnen Filamenten (Mikrofilamente), in deren Verband in einem unregelmäßigen Muster kurze spindelförmige Verdichtungen (dense bodies) angeordnet sind (Abb. 1ob). Diese Anordnung erinnert deutlich an die Verteilung von Aktin und Myosin in glatten Muskelzellen, was jedoch eindeutig erst durch immunhistologische Studien bewiesen werden könnte. Im übrigen Cytoplasma bis hin in Kernnähe finden sich eher aufgefaserte und locker gepackte Bündel, bestehend aus Filamenten von ca. 1o bis 12 nm im Durchmesser (Intermediärfilamente), die als verzweigte Bündel, aber auch in paralleler Anordnung in Verbindung mit Desmosomen vorkommen. Zwischen den verschiedenen Filamentsystemen sind die Mikrotubuli, häufig einander überkreuzend, überwiegend in der Längsrichtung der Zellen verlaufend, angeordnet. Die genaue räumliche Verbindung zwischen Mikrofilamenten und Mikrotubuli ist an Hand der Schnittpräparate nicht erkennbar (Abb. 1oa).

Abb.9

Ultrastruktur der Myofibroblasten



A: Zellkern mit perinucleärer Zisterne und rauhem endoplasmatischem Retikulum (ER), Mitochondrien (M) und einigen Fetttropfen (F). Vergrößerung 25080 x

B: Stark aufgeweitete Bereiche des rauhen ER. Vergrößerung 30096 x

Abb.16

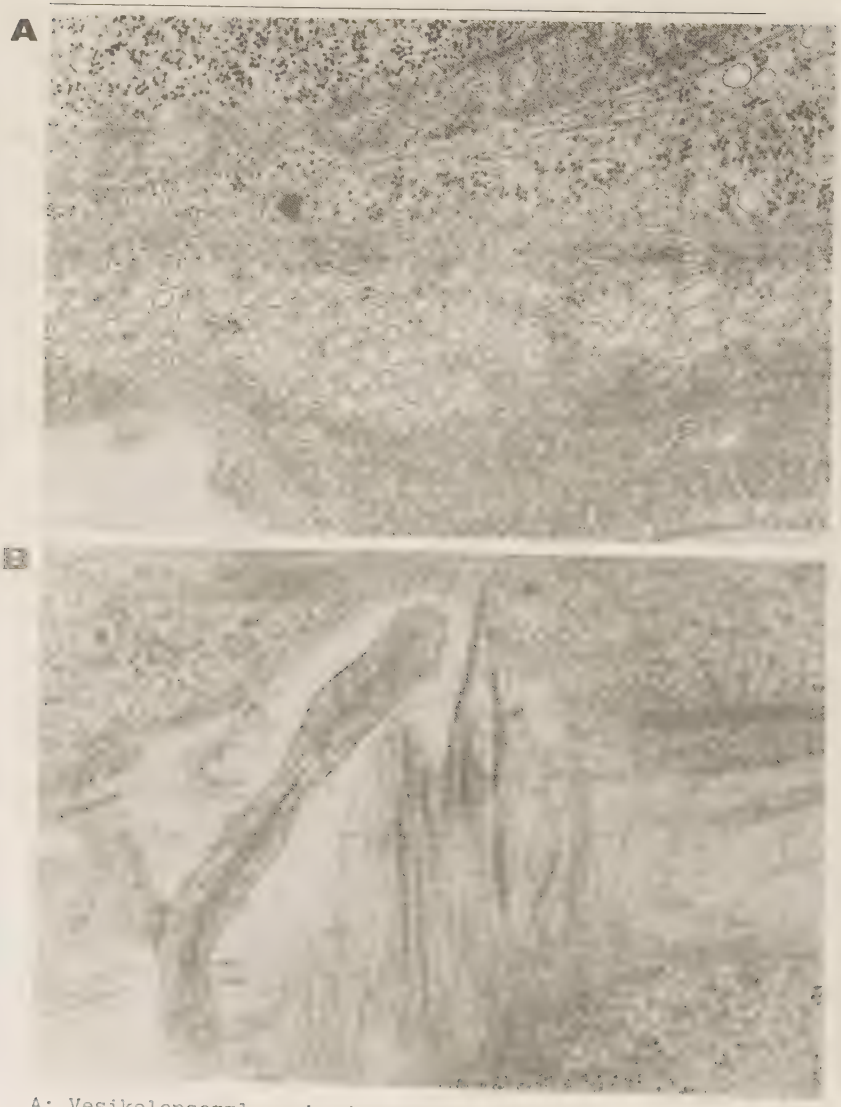
Ultrastruktur der Myofibroblasten

Unmittelbar unter der Plasmamembran sind in nahezu allen Zellen der Kultur dichte Ansammlungen von glattrandigen Vesikeln sichtbar, die häufig durch Bündel von Filamenten in längsorientierte Gruppen unterteilt liegen (Abb. 11a). In unmittelbarer Nähe der Plasmamembran sind zahlreiche dieser Vesikel im Prozess der Exozytose nachweisbar. Außerhalb der Kulturzellen im Interzellularraum wurden verschieden dicke Fasern beobachtet, von denen ein Teil an Hand der in der Einleitung beschriebenen (Abb. 1) charakteristischen Querstreifung als Kollagenfibrillen zu identifizieren ist (Abb. 11b).

Die in der Primärkultur an Hand der Zellform und Größe als zweite Population abgetrennte Zellfraktion (endotheliale Zellen) unterscheidet sich trotz der phasenkontrastmikroskopisch deutlichen Differenz (Abb. 5 und 7) elektronenoptisch nicht wesentlich von den bisher beschriebenen sog. Myofibroblasten. Auch diese Zellen enthalten die typischen Zellorganellen und auch das Filamentsystem in ähnlicher Ausprägung. Sie werden deshalb nicht noch einmal im Detail beschrieben (Abb. 12). Im Unterschied zu den Myofibroblasten ist ihre geringere Größe zu beachten, das Fehlen der breiten unregelmäßigen Zellausläufer und ihre gleichmäßigere Form, wie sie auch schon im Phasenkontrastmikroskop gesehen wurde.

Abb.11

Ultrastruktur der Myofibroblasten



A: Vesikelansammlung in der Nähe der Zellmembran, z.T. Vesikel in Exozytose. Vergrößerung 55404 x
B: Interzellularraum mit Kollagenfibrillen (vergl. Abb.1). Vergrößerung 50160 x

Abb.12

Ultrastruktur der endothelialen Zellen

Übersicht über zwei endotheliale Zellen, die besonders das Verhältnis vom Kern zum Cytoplasma verdeutlicht. Vergrößerung 9120 x

3.3. Wachstumsverhalten von Myofibroblasten und endothelialen Zellen in der Primärkultur

3.3.1. Adhärens der beiden Zellfraktionen im Vergleich

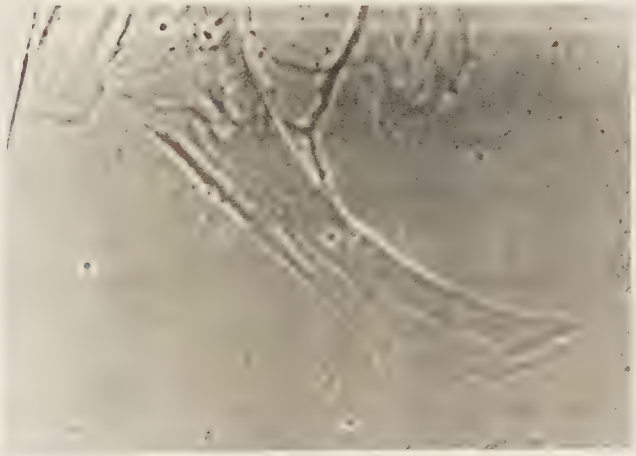
Die Anheftung der Zellen an das Kulturgefäß wurde, wie unter 2.2.2. beschrieben, ausgezählt. Bei den Affenleberzellen wurde 45 Std. nach Aussaat zum ersten Mal das Medium gewechselt. Alle bis dahin nicht adhärenten Zellen wurden verworfen. Als adhärent betrachtet und gezählt wurden lediglich diejenigen Zellen, die vollständig ausgebreitet waren, wie in in Abb. 13 gezeigt wird. Nach 45 Std. waren ca. 12 % der Myofibroblasten und 7 % der endothelialen Zellen an das Kulturgefäß angeheftet. Eine leichte Verfälschung dieses Ergebnisses durch bereits proliferierende Zellen konnte nicht ausgeschlossen werden. Auf Grund der Generationszeit der Zellen ist diese Verfälschung jedoch zu vernachlässigen.

3.3.2. Proliferation der beiden Zelltypen im Vergleich

Die Teilungsgeschwindigkeit der Zellen in der Primärkultur wurde mit Hilfe von zwei verschiedenen Methoden untersucht:
45 Std. nach Aussaat wurden die adhärenten Zellen gezählt, wie unter 3.3.1. beschrieben. Dieser Zeitpunkt wurde als Versuchsbeginn definiert. Danach wurden die Zellen bis zur vollständigen Konfluenz wachsen gelassen. Sie wurden vorsichtig, durch Abschaben von der Kulturflasche mit einem Teflonspatel geerntet und gezählt. Bei dichter Konfluenz wurden immer zwischen 5 und 6×10^6 Zellen in einer Flasche mit 25 cm^2 Bodenfläche gefunden. Die

Abb.13

Adherente Zellen in der Primärkultur



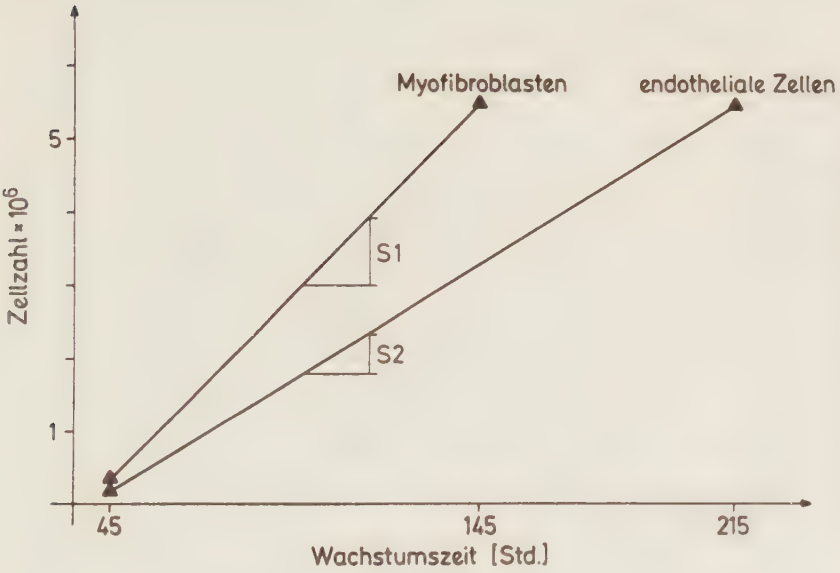
Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme (s. 2.2.13.) eines vollständig an das Kulturgefäß angehefteten Myofibroblasten 45 Std. nach Kulturbeginn.
Vergrößerung 320 x

Wachstumszeit bis zur Konfluenz wurde gegen die Zellmenge aufgetragen (Abb. 14). Dabei wurde willkürlich eine lineare Proliferation angenommen. Diese Annahme ließ sich durch das folgende Experiment (s.Abb. 15) bestätigen. Die langsam ansteigende Anlaufphase der Proliferation konnte durch den Beginn des Versuches 45 Std. nach Aussaat der Zellen ausgeschlossen werden. Aus den Steigungen der in Abb. 14 aufgezeichneten Wachstumsgeraden ($S_1 : S_2 = 1,7$) kann abgelesen werden, daß Myofibroblasten in der Primärkultur ungefähr 1,7 mal so schnell proliferieren wie die endothelialen Zellen.

In einem zweiten Experiment wurde der Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA während der Primärkultur untersucht (s. 2.2.3.). Wie aus Abb. 15 hervorgeht, konnte mit Hilfe dieser Methode das Zellzählungsergebnis bestätigt werden. Vergleicht man die Steigungen im linearen Teil der Wachstumskurve ($S_1 : S_2 = 1,94$), wird eine 2 mal so schnelle Proliferation der Myofibroblasten gegenüber den endothelialen Zellen deutlich. Die Myofibroblasten haben offensichtlich bereits nach 7o Std. vollständige Konfluenz erreicht. Die darauffolgende Abnahme des ^3H -Thymidin Gehaltes in der DNA ist auf das Absterben der ersten Zellen zurückzuführen. In dem Zellzählungsexperiment zur Errechnung der Proliferationsrate kann dieses Abknicken der Wachstumskurve nicht auftreten (Abb. 14), da ohne Vitalfärbung auch tote Zellen mitgezählt werden. Hieraus läßt sich auch die im Zählexperiment gegenüber dem Einbauversuch scheinbar etwas geringere Proliferationsrate der Myofibroblasten erklären.

Abb.14

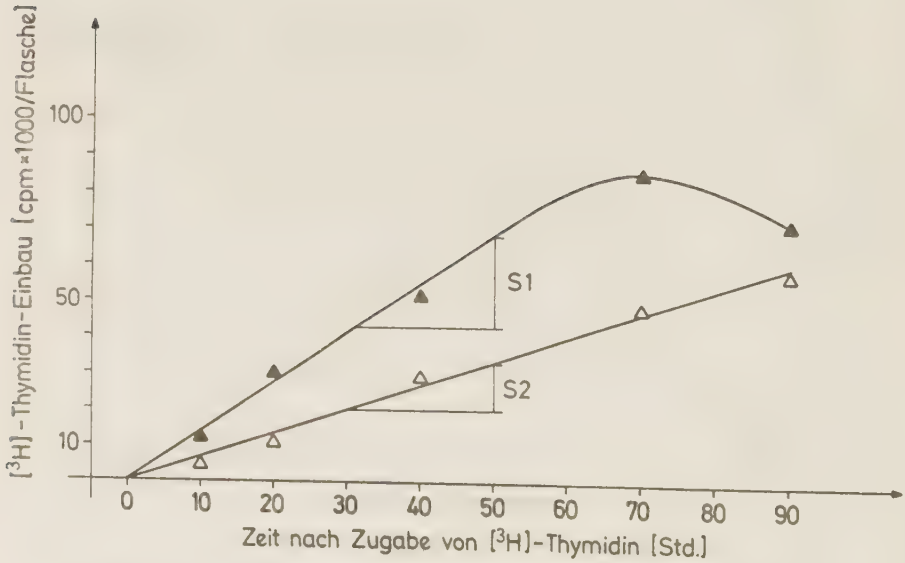
Untersuchung der Proliferation von Myofibroblasten und endothelialen Zellen durch Zellzählung



Durch Dichtegradientenzentrifugation gereinigte Myofibroblasten und endotheliale Zellen (s.2.1.5.) wurden 45 Std. kultuviert (s. 2.1.6.), danach wurde das Medium gewechselt. Zu diesem Zeitpunkt wurden die angehefteten und ausgebreiteten Zellen erstmals gezählt (s.2.2.2.). Die Zellen wurden bis zur Konfluenz wachsen gelassen, zunächst in der Kulturflasche gezählt, danach durch Abkratzen geerntet und in der Zählkammer erneut gezählt. Die Wachstumszeit bis zur Konfluenz ist gegen die Zellzahl aufgetragen.
Die zunächst willkürlich angenommene lineare Wachstumsgerade ließ sich durch spätere Versuche (s.Abb.15) als richtig bestätigen.

Abb.15

Untersuchung der Proliferation von Myofibroblasten und endothelialen Zellen durch Einbau von ^{3}H -Thymidin in die DNA



Der Einbau von ^{3}H -Thymidin in die DNA der Kulturzellen, die Extraktion der DNA und die Bestimmung der in die DNA eingebauten Radioaktivität wurde exakt nach der unter 2.2.3. beschriebenen Methode durchgeführt. 45 Std. nach Aussaat der Zellen wurde das Kulturmedium gewechselt und das radioaktive Thymidin zugegeben. Dieser Zeitpunkt wurde in der Abbildung als 0 bezeichnet.
Myofibroblasten: ▲—▲ endotheliale Zellen: △—△

3.4. Qualitative Analyse der Biosynthese von Bindegewebsproteinen durch Primärkulturen von Myofibroblasten und endothelialen Zellen

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wurden mit Hilfe von immunfluoreszenzoptischen Methoden im Lebergewebe folgende Bindegewebsproteine gefunden: Typ I und Typ III Prokollagen bzw. Kollagen, Typ IV Kollagen sowie die Glykoproteine Fibronektin und Laminin (8,9).
Mit Hilfe von Markierung der Zellen während der Primärkultur mit einer radioaktiven Aminosäure sollten diese auf ihre Fähigkeit zur Biosynthese von den genannten Bindegewebsproteinen und von Typ V Kollagen untersucht werden. Die radioaktiv markierten Proteine sollten mit Hilfe von zum Teil in der Literatur etablierten Methoden der Proteinchemie (52,72,84,85) voneinander getrennt und durch Elektrophorese mit darauffolgender Fluorographie in Gegenwart von entsprechenden Markerproteinen identifiziert werden. Diese Versuche hatten zunächst keine proteinchemische Reinigung zum Ziel, sondern lediglich eine Trennung der Bindegewebsproteine bis zu dem Punkt, an dem sich die einzelnen Substanzen bei der elektrophoretischen Auftrennung möglichst wenig überlagern.

3.4.1. Markierung der Biosyntheseprodukte mit ^{3}H -Prolin

Da es sich physiologisch bei Bindegewebsproteinen um extrazelluläre Proteine handelt, wurde versucht, den Zeitpunkt für die radioaktive Markierung der Zellen so zu wählen, daß am Ende des Markierungsexperimentes der größte Teil der Bindegewebsproteine bereits ins Kulturmedium sezerniert worden ist. Ein solches

Verfahren hat den Vorteil, daß die Anzahl der zu analysierenden Proben im vertretbaren Rahmen gehalten werden kann, da nicht immer Kulturmedium und Zellextrakt verglichen werden müssen.

Wurde die Zellkultur genau bei Erreichen der Konfluenz mit radioaktivem Prolin inkubiert (s. 2.1.7.), wurde nach 24 Std. 8o bis 9o % der kollagenassoziierten Radioaktivität im Medium (52) gefunden und der Rest der Aktivität in der neutralsalzlöslichen Fraktion des Zellextraktes (s. 2.1.8.). In der säurelöslichen Fraktion des Zellextraktes wurde nur eine vernachlässigbar geringe Menge von weniger als 2 % an Radioaktivität gemessen. Wichtig war, daß die Vorinkubation der Kulturen mit Medium ohne fötalem Kälberserum rechtzeitig, also 24 Std. vor Konfluenz der Zellen, begonnen wurde. Bei Beginn der Vorinkubation erst mit Erreichen der Konfluenz und demzufolge Zugabe der radioaktiven Aminosäure 24 Std. nach Konfluenz oder auch noch später wurde eine immer größere Menge an kollagenassoziierter Radioaktivität im Zellextrakt gefunden. Abb. 16 zeigt die Fluorographie (s. 2.2.7.) der elektrophoretischen Auftrennung (s. 2.2.6.) der Biosyntheseprodukte von Myofibroblasten in Medium und Zellextrakt bei radioaktiver Markierung unmittelbar bei und 36 Std. nach Konfluenz. Auffällig war das Auftreten größerer Mengen bereits fibrillären Kollagens (α_1 und α_2 Ketten) in Medium und Zellextrakt der 36 Std. nach Konfluenz markierten Kultur, während nur relativ geringe Mengen an Prokollagenen gefunden wurden. In den zum Zeitpunkt der Konfluenz markierten Kulturen dagegen wurden große Mengen Prokollagen im Medium identifiziert, während im Zellextrakt nur geringe Mengen an α_1 und α_2 Ketten vorhanden waren.

Abb.16

Elektrophorese von Kulturmedium und Zellextrakt der Myofibroblasten bei radioaktiver Markierung der Zellen bei Konfluenz und 36 Std. nach Konfluenz

Je eine Myofibroblastenkultur wurde unmittelbar bei und 36 Std. nach Konfluenz mit ^{3}H -Prolin versetzt und 24 Std. inkubiert (s. 2.1.7.). Bindegewebsproteine wurden danach nach der unter 2.1.8. beschriebenen Methode aus Medium und Zellen getrennt extrahiert. Je 30 µl der Medium- und Zellextraktfraktionen wurden nach Reduktion mit DTE elektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.2.4.) und durch Fluorographie (s. 2.2.5.) analysiert. Die Fluorographie wurde 7 Tage auf Röntgenfilm inkubiert.

1: Zellextrakt 36 Std. nach Konfluenz markiert
2: Medium 36 Std. nach Konfluenz markiert
3: Zellextrakt bei Konfluenz markiert
4: Medium bei Konfluenz markiert

Im säurelöslichen Zellextrakt konnte nur ein sehr kleiner, kaum über der Nachweisgrenze liegender Teil an α_1 Ketten gemessen werden. Diese Identifizierung war nur nach Einsetzen des gesamten aus einer Zellkulturflasche von 75 cm^2 Bodenfläche gewonnenen Extraktes in eine Elektrophoreseprobe und fluorographischer Inkubation von 6 Wochen möglich. Aus diesem Grund wurde der säurelösliche Zellextrakt in allen folgenden Versuchen außer Acht gelassen.
Bei der Auftrennung der Biosyntheseprodukte von endothelialen Zellen wurde in den in der späteren Wachstumsphase markierten Kulturen die gleiche Verschiebung der Produkte zu Gunsten von fibrillärem Kollagen beobachtet. Auch hier wurden nur unwesentliche Mengen an α_1 Ketten im säurelöslichen Zellextrakt gefunden.

3.4.2. Trennung von Bindegewebsproteinen aus Zellkulturmedium durch DEAE-Chromatographie

Wie in 3.4.1. beschrieben, wird in Zellkulturen, die unmittelbar bei Erreichen der Konfluenz mit ^3H -Prolin markiert werden, lediglich im Kulturmedium eine große Menge verschiedener Kollagenketten, insbesondere auch Prokollagen, gefunden, während im Zellextrakt ausschließlich α_1 und α_2 Ketten auftreten. Aus diesem Grund wurde im folgenden Versuch nur das Kulturmedium weiter analysiert.
Burke et al. (52) haben die Fraktionierung von Typ I und III Prokollagenen aus Zellkulturen von glatten Muskelzellen durch Ionenaustauschchromatographie beschrieben. Crouch und Bornstein (84) haben Typ IV Prokollagen durch DEAE-Chromatographie von anderen Kollagenen abgetrennt, wobei Typ IV Prokollagen im Gegensatz zu

den anderen Kollagenen nicht an DEAE-Cellulose bindet. Timpl et al. (72) beschreiben die Reinigung des Glycoproteins Laminin mit Hilfe von DEAE-Chromatographie auf die gleiche Weise. In allen genannten Arbeiten wird zusätzlich das Verhalten des Glycoproteins Fibronektin in der Ionenaustauschchromatographie charakterisiert. Es lag also nahe, eine Trennung aller dieser Bindegewebsproteine in einem Schritt durch Chromatographie an DEAE-Cellulose zu versuchen, denn in der elektrophoretischen Auftrennung des kompletten ungereinigten Mediums ist keine Unterscheidung zwischen Typ I und III Prokollagenen zu treffen, außerdem waren keinerlei Glycoproteine nachweisbar (Abb. 16).

Das Fehlen von Glycoproteinen bei dieser Analysemethode ist jedoch möglicherweise auf einen relativ zu geringen Anteil am Gesamtbindegewebsprotein zurückzuführen. Es muß noch darauf hingewiesen werden, daß auch nach der Fraktionierung der Medien durch DEAE-Chromatographie nur ein qualitatives Ergebnis über die Kollagen- und Glycoproteinzusammensetzung erwartet werden kann (86). In Abb. 17 werden die Elutionsprofile der radioaktiv markierten Proteine der Medien von der DEAE-Säule (Durchführung s. 2.1.9.) gezeigt. Die Proteine der einzelnen Peaks wurden anschließend in der Elektrophorese durch darauffolgende Fluorographie, und zwar direkt (Abb. 18 A) sowie nach Reduktion mit DTE, um die Disulfidquervernetzungen der Prokollagene (s. Abb. 2) zu lösen (Abb. 18 B), analysiert. In den Elektrophoresen ohne Reduktion wird vor allem die Existenz von Typ V Kollagen (85) deutlich, das nach der Reduktion von den Prokollagenen teilweise überlagert wird. In Tab. 2 ist die Verteilung der verschiedenen

Abb. 17

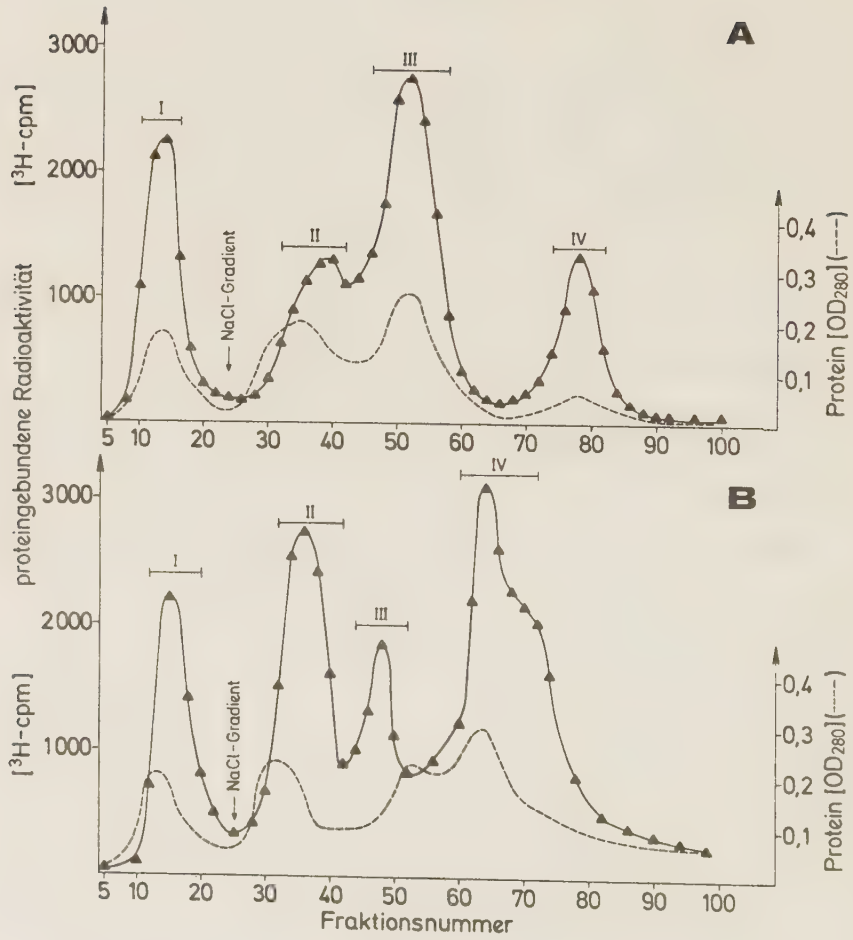

A
B
I
II
III
IV
NaCl-Gradient
proteingebundene Radioaktivität [³H-cpm]
Protein [OD280] (----)
Fraktionsnummer
3000
2000
1000
0,4
0,3
0,2
0,1
5 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

Abb.17

DEAE-Chromatographie der Kulturmedien von Myofibroblasten und endothelialen Zellen

---

Je 4 ml dialysiertes Kulturmedium (s. 2.1.8.) von Myofibroblasten (Abb.17 A) und von endothelialen Zellen (Abb.17B) wurde in Gegenwart von 12 mg Typ I Kollagen als Carrier auf eine DEAE-Säule (1,5 x 8 cm) aufgetragen und mit einem Gradienten von 0 - 300 mM NaCl eluiert. In Durchlauf und Eluat wurde die Radioaktivität (▲——▲) sowie Protein bei OD_{280} (-------) bestimmt (s. 2.1.9.). Die römischen Ziffern I - IV in der Abbildung bezeichnen diejenigen Fraktionen, die nach der Chromatographie vereinigt wurden.

Abb.18 A

Elektrophorese der DEAE-chromatographisch aufgetrennten Proteinfraktionen ohne Reduktion der Proben

Die Fraktionen der DEAE-Chromatographie wurden, wie in Abb.17 dargestellt, gepoolt, dialysiert und lyophylisiert. Je ein Aliquot (ca. 20%) der 4 Lyophylisate wurde in 20 µl Probenpuffer aufgenommen, elektrophoretisch getrennt und durch Fluorographie analysiert (Inkubation der Fluorographie 12 Tage).

1, 2, 3 und 4: Radioaktivitätspeaks der DEAE-Chromatographie

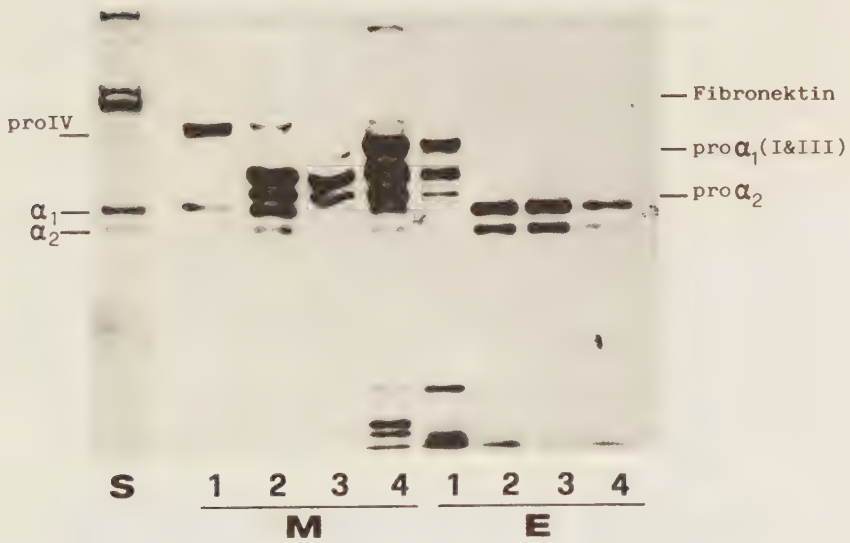
S: säurelösliches Typ I Kollagen aus Haut als Standard (Proteinfärbung)

M: Kulturmedium der Myofibroblasten

E: Kulturmedium der endothelialen Zellen

Abb.18 B

Elektrophorese der DEAE-chromatographisch getrennten Proteinfraktionen nach Reduktion mit DTE



Die Fraktionen der DEAE-Chromatographie wurden genauso behandelt wie unter Abb.18 A beschrieben. Die Elektrophoreseproben wurden jedoch mit 5 µl einer 50 mM DTE-Lösung versetzt.

1, 2, 3 und 4: Radioaktivitätspeaks der DEAE-Chromatographie

S: säurelösliches Typ I Kollagen aus Haut als Standard (Proteinfärbung)

M: Kulturmedium der Myofibroblasten

E: Kulturmedium der endothelialen Zellen

Kollagene und des Fibronektins, das in geringen Mengen gefunden werden konnte, auf die einzelnen Peaks der DEAE-Chromatographie noch einmal zusammengefaßt. Dabei wurden erhebliche Unterschiede zwischen den Biosyntheseprodukten von Myofibroblasten und endothelialen Zellen deutlich. Besonders auffällig ist das Vorhandensein von wesentlich größeren Mengen an fibrillärem Kollagen im Medium der endothelialen Zellen. Laminin, das wie das Prokollagen Typ IV im Durchlauf (Peak I) der DEAE-Säule zu finden sein sollte (72), scheint von keiner der beiden Zellarten synthetisiert zu werden.

3.4.3. Analyse von Laminin im 3,5 %igen Acrylamidgel

Wenn Laminin in der Primärkultur der Leberzellen synthetisiert würde, wäre es, wie bereits in 3.4.2. beschrieben, im Durchlauf der DEAE-Chromatographie zu erwarten (72). Im Durchlauf der DEAE-Säule wurde jedoch lediglich Prokollagen Typ IV gefunden (Abb. 18 B). Immunfluoreszenzoptische Daten gaben aber Anlaß zu der Vermutung, daß auch Laminin, wahrscheinlich nur in sehr geringen Mengen, synthetisiert wird (8). Auf Grund seiner Neigung zu starker Aggregation (72) (MG über 800.000) wäre es denkbar, daß Laminin unter den gegebenen Bedingungen (4,5 %iges Sammelgel, Reduktion mit DTE) gar nicht ins Gel einwandern kann. Um dieses auszuschließen, wurde der Durchlauf der DEAE-Chromatographie noch einmal auf ein 3,5 %iges Gel mit 2 % SDS, ohne Sammelgel (s. 2.2.8.), nach einer 1stündigen Inkubation mit 100mM DTE und 8M Harnstoff bei 60°C aufgetragen (Abb. 19). Aber auch unter diesen Bedingungen konnte weder im Medium noch im Zellextrakt Laminin nachgewiesen werden.

Tab. 2

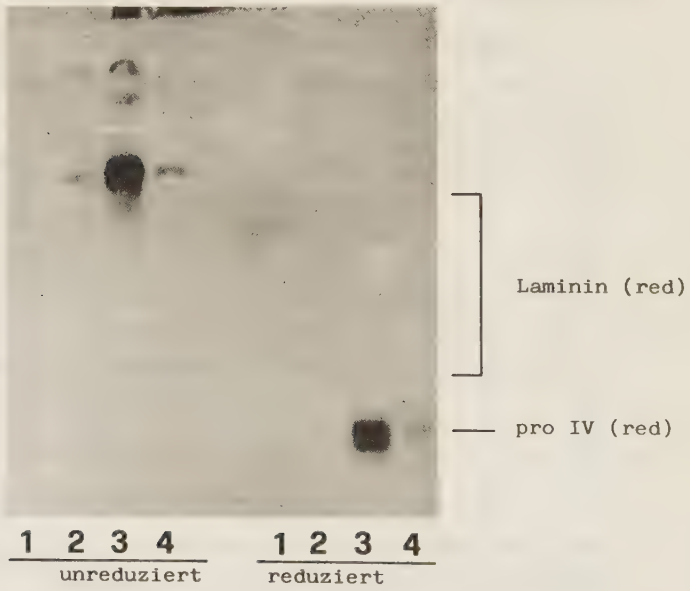
Fraktionierung der in der Primärkultur synthetisierten Kollagene und Glykoproteine durch DEAE-Chromatographie

	PEAK I	PEAK II	PEAK III	PEAK IV
Myofibroblasten	pro IV	Typ V Typ I Typ III	pro I Typ V	Fibro- nectin pro III pro I Typ V
endotheliale Zellen	Typ I Typ III	Typ I Typ III	Typ I Typ III	Fibro- nectin pro III pro I Typ V

Die DEAE-Chromatographie der Kulturmedien von Myofibroblasten und endothelialen Zellen wurde wie in 2.1.9. beschrieben durchgeführt. Die Fraktionen von 4 Peaks (s. Abb17) wurden jeweils vereinigt und durch Elektrophorese mit anschließender Fluorographie analysiert.

Abb.19

Elektrophorese in 3,5%igem Acrylamid zur Analyse von Laminin und Prokollagen Typ IV



Die radioaktiven Fraktionen der Durchläufe der DEAE-Chromatographien (Peak I) wurden gepoolt, dialysiert und lyophylisiert. 20% des Lyophylisates wurde in 40 µl Elektrophoreseprobenpuffer aufgenommen. Die Hälfte davon wurde ohne weitere Zusätze (unreduziert), die andere Hälfte in Gegenwart von 100 mM DTE und 8 M Harnstoff (reduziert) 1 Std. bei 60°C inkubiert und dann elektrophoretisch getrennt (s. 2.2.11.). Die Elektrophorese wurde 1 Std. nach Herauslaufen der Bromphenolblaubande gestoppt und durch Fluorographie analysiert (Inkubation der Fluorographie 20 Tage).
1: endotheliale Zellen, Medium
2: endotheliale Zellen, Zellextrakt
3: Myofibroblasten, Medium
4: Myofibroblasten, Zellextrakt
Die Pfeile geben die erwarteten Laufstrecken von Laminin und Typ IV Prokollagen an (72).

3.5. Quantitative Analyse der Biosynthese von Bindegewebsproteinen in Primärkulturen von Myofibroblasten und endothelialen Zellen

Im Hinblick auf die Problemstellung der vorliegenden Arbeit, an Hand eines Tiermodelles Möglichkeiten für die Untersuchung der Ausbildung eines Krankheitsbildes beim Menschen, das auf einer Steigerung der Bindegewebsproteinbiosynthese beruht, aufzuzeigen, wurde es wichtig, die identifizierten Bindegewebsproteine (s. 3.4.) zu quantifizieren. Diese Notwendigkeit wird durch den Vergleich der Biosyntheseprodukte der beiden isolierten Zelltypen besonders deutlich: Beide Zellarten synthetisieren in der Primärkultur ein bis auf einen Kollagentyp identisches Bindegewebsproteinmuster, welches sich aber offensichtlich in den quantitativen Verhältnissen erheblich unterscheidet (Abb. 18).

3.5.1. Isolierung und vergleichende Quantifizierung von Prokollagen Typ IV aus Medium und Zellextrakt beider Zellfraktionen

Das Problem der Isolierung des Typ IV Prokollagens kann bereits als gelöst betrachtet werden. Wie unter 3.4.2. beschrieben wird, ist dieses Protein im Durchlauf einer DEAE-Chromatographie des Kulturmediums in nahezu reiner Form vorzufinden (Abb. 18). Es wurden zusätzlich noch DEAE-Chromatographien von Zellextrakten durchgeführt und die Durchläufe ebenfalls durch Elektrophorese mit anschließender Fluorographie analysiert. In Abb. 19 sind die Durchläufe der Ionenaustauschchromatographien von Medien und Zellextrakten von Myofibroblasten und endothelialen Zellen dargestellt. Mit Hilfe von Densitometrie der Fluorogramme

(s. 2.2.9.) wurde eine vergleichende quantitative Auswertung durchgeführt. Ausgewertet wurden lediglich die Proben, die vor der Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen inkubiert worden waren, da es in unreduzierten Fraktionen durch unspezifische Aggregationen oder durch Reste anderer Kollagene, die in unreduzierter Form ein gleiches bzw. sehr ähnliches Molekulargewicht haben wie unreduziertes Prokollagen Typ IV, zu einer Verfälschung der Analyse kommen könnte. Wie in Abb. 19 sichtbar ist, kann in allen unreduzierten Proben im Molekulargewichtsbereich von unreduziertem Typ IV Prokollagen Protein gefunden werden. In den reduzierten Proben von Medium und Zellextrakt der endothelialen Zellen ist jedoch kein Typ IV Prokollagen mehr sichtbar. In Medium und Zellextrakt der Myofibroblasten wurde Prokollagen Typ IV im Verhältnis von 16 : 1 gemessen. Diese geringe Menge von Prokollagen Typ IV im Zellextrakt kann vernachlässigt werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß mit Hilfe der hier verwendeten Methoden lediglich im Medium der Myofibroblastenkultur eine bedeutende Menge an Prokollagen Typ IV gefunden wurde.

3.5.2. Isolierung und vergleichende Quantifizierung von Typ I und III Kollagenen aus Medium und Zellextrakt beider Zellfraktionen

Eine in der Literatur häufig diskutierte Frage ist die Änderung des Verhältnisses von Typ I zu Typ III Kollagen von der normalen zur pathologisch veränderten Zelle des fibrotischen Gewebes (17,45,46). Um diese Frage einer Klärung näher zu bringen, mußte zunächst einmal eine im Hinblick auf die spätere Untersuchung von humanen Leberzellen möglichst einfache und im Mikromaßstab

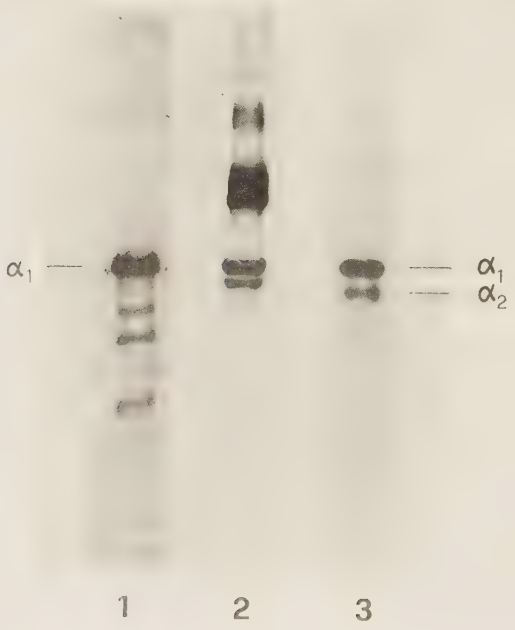
durchführbare Methode zur Reinigung der beiden Kollagentypen durchgeführt werden.

Im ersten Schritt wurde nach Zusatz von 1 mg/ml säurelöslichem Typ I Kollagen aus Haut als Carrier ein Pepsinabbau 15 Std. bei 4°C durchgeführt, um auch die Prokollagene zu α_1 und α_2 Ketten abzubauen und so alle Synthesestufen der Typ I und III Kollagene zu erfassen (s. 2.1.1o.). Darauffolgend wurde Typ III Kollagen mit o,7 M NaCl präcipitiert. Durch Erhöhung des Salzgehaltes im Überstand auf 2,7 M wurde Typ I Kollagen gefällt (s. 2.1.11.). Diese Form der fraktionierten Salzfällung hat sich als vorteilhaft herausgestellt, da hierdurch eine völlig reine Typ III Kollagen Fraktion und eine nur durch sehr wenig Typ III verunreinigte Typ I Kollagen Fraktion gewonnen wurde. Bei Anwendung der in der Literatur beschriebenen (17,51,62) Fällung von Typ III Kollagen mit 1,8 M NaCl aus einem gegen 5o mM Tris-HCl, pH 7,4, dialysierten Pepsinabbau wurde eine relativ große Menge (bis zu 5o %) Typ I Kollagen mitgefällt. Auf der anderen Seite wurde auch nach Erhöhung der zugegebenen Carriermenge mit der von Chung et al. (1976) (87) veröffentlichten Fällungsmethode mit o,9 M NaCl kaum Typ I Kollagen mitgefällt, sondern hauptsächlich Typ III. In Abb. 2o wird die Reinigung von Typ III und Typ I Kollagen durch fraktionierte Salzfällung demonstriert.

Das zweite Problem wird mit der Quantifizierung der gereinigten Kollagenfraktionen gestellt. Die in der Literatur häufig beschriebene Methode der Messung des Hydroxyprolingehaltes schied aus, da der Handtest (88) zu unempfindlich war, die sehr geringen Mengen an neusynthetisiertem Kollagen zu bestimmen. Eine zweite, und wohl die genaueste Quantifizierungsmethode durch

Abb.20

Reinigung von Typ III und Typ I Kollagenen durch fraktionierte Salzfällung



Nach Durchführung eines Pepsinabbaus 15 Std. bei 4°C in Medien und Zellextrakten wurden alle Fraktionen zunächst 16 Std. mit 0,7 M NaCl präcipitiert. Der Überstand wurde auf 2,7 M NaCl angehoben und nochmals 16 Std. präcipitiert. Beide Präcipitate und der Überstand wurden durch Elektrophorese mit anschließender Fluorographie (s. 2.2.4. und 2.2.5.) analysiert (Inkubation der Fluorographie 14 Tage). Im Überstand wurde kein Protein gefunden. Die Abbildung zeigt die fraktionierte Salzfällung am Beispiel des Myofibroblastenmediums.

1: Präcipitat durch 0,7 M NaCl
2: säurelösliches Typ I Kollagen aus Haut als Standard (Proteinfärbung)
3: Präcipitat durch 2,7 M NaCl

Bestimmung des radioaktiven Hydroxyprolins im Aminosäureanalysator mußte auf Grund der im Labor vorhandenen technischen Gegebenheiten im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls ausscheiden. Als sehr genaue Messmethode, vor allem was den Ausschluß von Verunreinigungen der Kollagenpräparationen betrifft, bot sich die Densitometrie (s. 2.2.9.) der Fluorogramme nach der Elektrophorese an. Auf diese Weise konnten zwar nur relative Verhältnisse der einzelnen Kollagenfraktionen zueinander und keine absoluten Kollagenmengen angegeben werden; im Rahmen der vorliegenden Problemstellung war dies jedoch vollständig ausreichend.

Um die Densitogramme untereinander vergleichen zu können, mußte gewährleistet werden, daß jeweils vergleichbare Probenanteile auf die Elektrophorese aufgetragen wurden. Durch Auftrag gleicher Proteinmengen konnte dieses nicht gesichert werden, da in den einzelnen Aufarbeitungsschritten relativ zur Kollagenmenge sehr unterschiedliche Proteinmengen gefällt wurden. Es war also notwendig, die Messungen immer auf die Anzahl der Zellen, die für die Biosyntheseprodukte verantwortlich waren, zu beziehen. Dies erforderte ein peinlich genaues Einhalten der Aufarbeitungsschritte, wie es in dem in Abb. 21 dargestellten schematischen Beispiel klargemacht werden soll. Wenn auf diese im Schema beschriebene Weise verfahren wurde, konnten die Densitogramme der Fluorographien der Elektrophorese aller Fraktionen direkt miteinander verglichen werden.

Abb. 22 zeigt die Densitogramme der Typ III und Typ I Kollagene am Beispiel der Myofibroblasten. Im ersten Schritt der Auswertung durch Flächenintegration der Peaks wurde die Verunreinigung der Typ I Kollagen Fraktion durch Typ III berechnet:

Abb.21

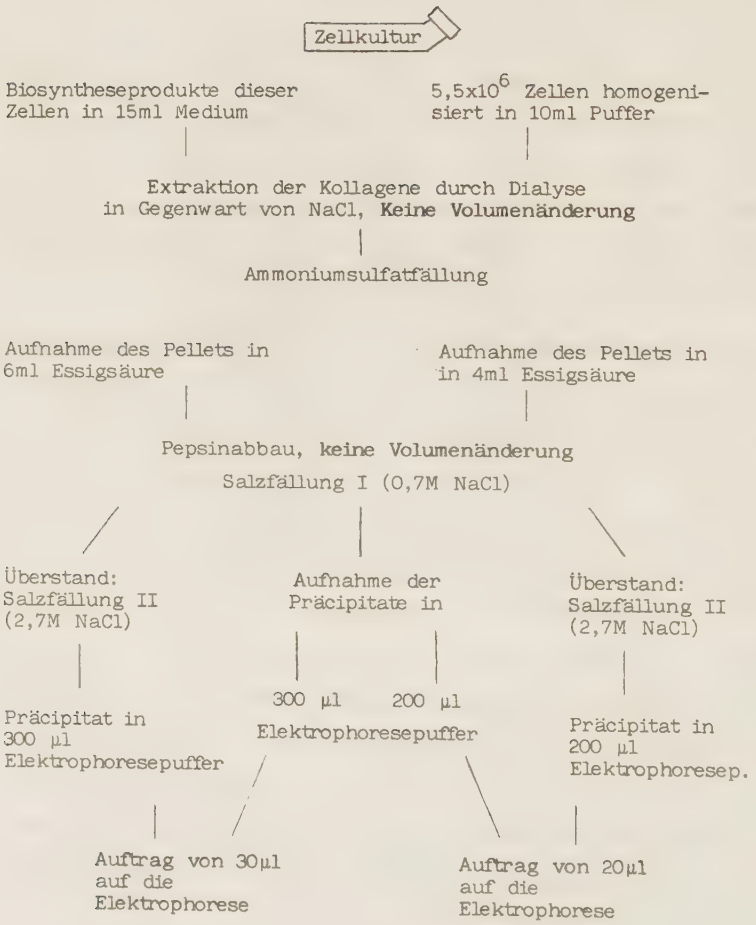
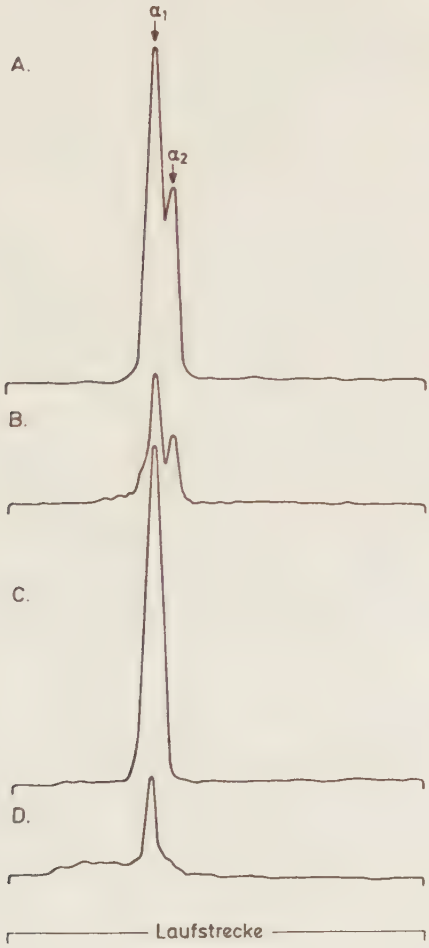

Zellkultur
Biosyntheseprodukte dieser Zellen in 15ml Medium
5,5x10^6 Zellen homogenisiert in 10ml Puffer
Extraktion der Kollagene durch Dialyse in Gegenwart von NaCl, Keine Volumenänderung
Ammoniumsulfatfällung
Aufnahme des Pellets in 6ml Essigsäure
Aufnahme des Pellets in in 4ml Essigsäure
Pepsinabbau, keine Volumenänderung
Salzfällung I (0,7M NaCl)
Überstand: Salzfällung II (2,7M NaCl)
Aufnahme der Präcipitate in
Überstand: Salzfällung II (2,7M NaCl)
300 µl
200 µl
Elektrophoresepuffer
Präcipitat in 300 µl Elektrophoresepuffer
Präcipitat in 200 µl Elektrophoresep.
Auftrag von 30µl auf die Elektrophorese
Auftrag von 20µl auf die Elektrophorese

Abb.22

Densitometrische Analyse der Fluorogramme der gereinigten Kollagene Typ I und III



Aus 7,5 ml Medium und 5 ml Zellextrakt (s.2.1.8.) einer Myofibroblastenkultur wurde nach einem Pepsinabbau (s.2.1.10.) Typ III Kollagen mit 0.7 M NaCl gefällt, Typ I Kollagen mit 2,7 M NaCl (s.2.1.11.). Die Präcipitate wurden in 100 µl Elektrophoreseprobenpuffer (s.2.2.4.) aufgenommen. 20 µl wurden nach Reduktion mit DTE elektrophoretisch aufgetrennt und durch Fluorographie (s.2.2.5.) analysiert. Die Fluorogramme wurden 21 Tage auf Röntgenfilm inkubiert. Die Röntgenfilme wurden bei einer Wellenlänge von 550 nm im Densitometer gemessen (s.2.2.7.).

A: Typ I Kollagen aus Medium
B: Typ I Kollagen aus Zellextrakt
C: Typ III Kollagen aus Medium
D: Typ III Kollagen aus Zellextrakt

Typ I Kollagen enthält α_1 und α_2 Ketten im Verhältnis $\left[\alpha_1(I)\right]_2 \alpha_2$, Typ III Kollagen enthält lediglich $\left[\alpha_1(III)\right]_3$. $\alpha_1(I)$ und $\alpha_1(III)$ erscheinen in der Elektrophorese in einer Bande, d.h. im Densitogramm in einem Peak. Die α_2-Peakfläche muß also mit 2 multipliziert und dann von der α_1-Peakfläche subtrahiert werden. Die Restfläche ergibt die Verunreinigung durch Typ III Kollagen. Im Fall der Affenlebermyofibroblasten in Primärkultur (Abb. 2o) war die Typ I Fraktion des Mediums mit 14 % Typ III verunreinigt, die Typ I Fraktion des Zellextraktes mit 11 %.

Nachdem die Verunreinigung bekannt war, konnte im zweiten Schritt das Verhältnis von Typ I zu Typ III Kollagen berechnet werden. Insgesamt wurden von den Myofibroblasten 49 % Typ III und 51 % Typ I Kollagen synthetisiert, wobei am Ende der Aufarbeitung 39 % Typ I im Medium, 12 % im Zellextrakt, 41 % Typ III im Medium und 8 % im Zellextrakt lokalisiert wurde. Die beschriebene Reinigung und Quantifizierung wurde in der gleichen Weise auch mit endothelialen Zellen durchgeführt. Alle Ergebnisse zur Biosynthese von Typ I und Typ III Kollagen in beiden Zellarten sind in Tab.3 zusammengefaßt.

Zuletzt stand noch der Vergleich der Gesamtsynthese von Typ I bzw. Typ III Kollagen in den beiden Zellarten untereinander aus. Es wurde eine nahezu gleiche Syntheserate an Typ I und III Kollagen in den Primärkulturen der Myofibroblasten und der endothelialen Zellen gefunden.

Tab.3

Biosynthese von Typ I und Typ III Kollagenen in Primärkulturen von Myofibroblasten und endothelialen Zellen

		Typ I (in % von Typ I+III Kollagenen)	Typ III	Typ I / Typ III
Myofibroblasten	Medium	39	41	
	Zellen	12	8	
	Gesamt	51	49	1,05 ±0,12*
endotheliale Zellen	Medium	36	45	
	Zellen	5	14	
	Gesamt	41	59	0,69 ±0,07*

Die Zellkulturen wurden nach den in Abb.21 dargestellten Schema aufgearbeitet und,wie im Text beschrieben ,quantitativ ausgewertet.
Die angegebenen %-Werte stellen ein Mittel aus 4 verschiedenen Versuchen dar.

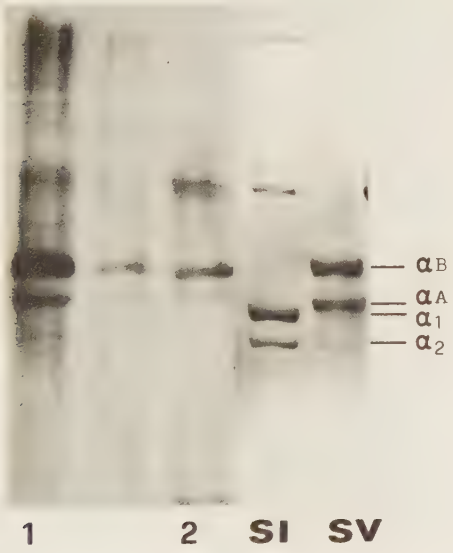
* Die angegebenen Abweichungen sind auf je 4 verschiedene Versuche zurückzuführen.

3.5.3. Isolierung und vergleichende Quantifizierung von Typ V Kollagen in Medium und Zellextrakt beider Zelltypen

Die Existenz von Typ V Kollagen konnte nach der DEAE-Chromatographie (Abb. 18) in zahlreichen Fraktionen, vor allem unter den Biosyntheseprodukten der Myofibroblasten, nachgewiesen werden. Da das Typ V Kollagen über das gesamte Säuleneluat verteilt war, war eine Quantifizierung nach DEAE-Chromatographie nicht möglich. Aus diesem Grund wurde wie bei Typ I und Typ III auch hier eine separate Reinigung direkt aus dem Medium bzw. dem Zellextrakt durchgeführt, wie unter 2.1.12. beschrieben. Es soll noch einmal auf die Notwendigkeit der genauen parallelen Aufarbeitung ausgehend von den konfluenten Zellkulturen, wie in Abb. 21 veranschaulicht, hingewiesen werden. Das Typ V Präcipitat wurde in Elektrophoresepuffer aufgenommen und, wie in 3.6.2. beschrieben, mit Hilfe von Fluorographie und Densitometrie analysiert. In Abb. 23 wird die Fluorographie des gereinigten Typ V Kollagens gezeigt. Leichte Verunreinigungen der Präparation durch andere Kollagene können hier in Kauf genommen werden, da keines der verunreinigenden Proteine in der Elektrophorese in unmittelbarer Nähe der Typ V Banden läuft. Beim Vergleich der Typ V Kollagenmengen aus Myofibroblasten und endothelialen Zellen durch Densitometrie ergab sich eine um den Faktor 7 höhere Syntheserate dieses Kollagens in Myofibroblasten, wobei bei beiden Zellarten alles Typ V Kollagen im Medium gefunden wurde.

Abb.23

Fluorographie von gereinigtem Typ V Kollagen aus Kulturmedium



Typ V wurde aus Kulturmedien und Zellextrakten von Myofibroblasten und endothelialen Zellen, wie unter 2.1.12. beschrieben, gereinigt und nach der Elektrophorese fluorographisch analysiert (Inkubation 12 Tage). In Zellextrakten wurde kein Typ V Kollagen gefunden.
1: Typ V Kollagen aus Myofibroblasten
2: Typ V Kollagen aus endothelialen Zellen
SI: säurelösliches Typ I Kollagen aus Haut als Standard
SV: Typ V Kollagen aus humanem Chorion-Amnion als Standard (SI und SV Proteinfärbungen)
(Der Kanal zwischen 1 und 2 enthält Typ V Kollagen aus endothelialen Zellen aus einer anderen Präparation.)

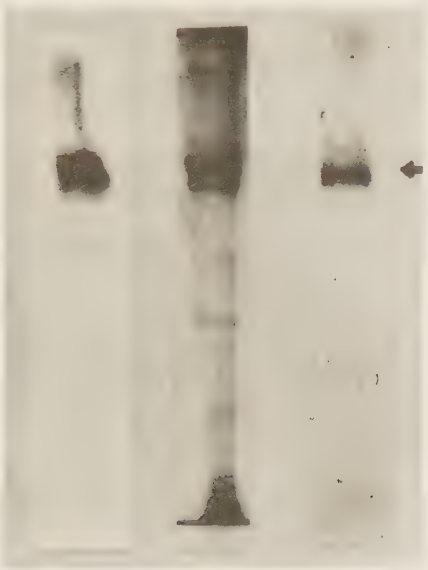
3.5.4. Vergleichende Quantifizierung von Fibronektin in Myofibroblasten und endothelialen Zellen

Wie aus Abb. 18 ersichtlich,wurde die Biosynthese von Fibronektin in scheinbar relativ geringen Mengen in beiden Zellfraktionen wahrscheinlich gemacht. Übereinstimmend mit den von mehreren Autoren veröffentlichten Daten (52,72) wurde im letzten Peak der DEAE-Chromatographie ein in der Elektrophorese im Bereich von Fibronektin laufendes Protein gefunden. Da dieses Protein jedoch im Vergleich zu den Kollagenen in sehr geringen Mengen zu finden war, konnte eine Verunreinigung durch ein anderes,nicht kollagenes Protein nicht ausgeschlossen werden. Außerdem bereitete die densitometrische Auswertung dieser Bande Probleme. Da es sich um eine äußerst schwache Bande neben sehr starken Banden handelt, erschien diese im Densitogramm nur als verschwindend kleiner Peak. Eine vergleichende Quantifizierung war daher mit einem sehr großen Fehler behaftet.

Eine Reinigung des Fibronektins mit Hilfe der in der Literatur (89,9o) beschriebenen Methoden schied aus, da auf Grund der bei einem solchen Vorgehen unvermeidbaren Proteinverluste im Hinblick auf die geringen Mengen an Ausgangsmaterial kein Erfolg zu erwarten war. Zur Lösung des Quantifizierungsproblems und der exakten Sicherung, daß es sich bei der fraglichen Bande wirklich um Fibronektin handelt, wurde die Methode der Immunpräcipitation herangezogen (s. 2.2.1o.). Es gelang, mit Antikörpern gegen Fibronektin sowohl aus der DEAE-Fraktion wie auch aus unbehandeltem Medium bzw. Zellextrakt ein Protein mit dem Molekulargewicht von 22o.ooo Dalton zu präcipitieren, das in der Elektrophorese nahezu frei von Verunreinigungen war (Abb. 24). Die

Abb.24

Immunpräcipitation von Fibronektin aus Kulturmedium von Myofibroblasten und endothelialen Zellen



Immunpräcipitationen mit anti-Fibronektin (Behringwerke, Marburg) wurden direkt aus Medien und Zellextrakten, wie unter 2.2.8. beschrieben, ausgeführt. Die Präcipitate wurden in Elektrophoreseprobenpuffer aufgenommen und in Gegenwart von 100 mM DTE und 8 M Harnstoff 30 Min. bei 60°C inkubiert. Nach der Elektrophorese wurden die Gele fluorographisch analysiert (Inkubation 20 Tage). Aus Zellextrakten ließ sich keinerlei Protein präcipitieren.
1: Immunpräcipitat aus Medium von Myofibroblasten
S: Fibronektin aus Humanplasma (Behringwerke, Marburg) als Standard (Proteinfärbung)
2: Immunpräcipitat aus Medium von endothelialen Zellen

densitometrische Analyse der Fluorographie ergab eine mehr als 5 mal höhere Synthese von Fibronektin in Primärkulturen von Myofibroblasten im Vergleich zu den endothelialen Zellen, wobei sämtliches Fibronektin im Kulturmedium gefunden wurde.

3.6. Bestimmung von kollagensynthetisierenden Enzymen in Primärkulturen von Myofibroblasten und endothelialen Zellen

Zur Unterstützung der in 3.5. beschriebenen Ergebnisse zur Biosyntheserate von verschiedenen Bindegewebsproteinen in Primärkulturen von Affenleberzellen wurden zwei Enzyme der Kollagenbiosynthese, das intrazelluläre Enzym Prolinhydroxylase sowie das extrazelluläre Enzym Lysinoxidase in den Zellkulturen bestimmt.

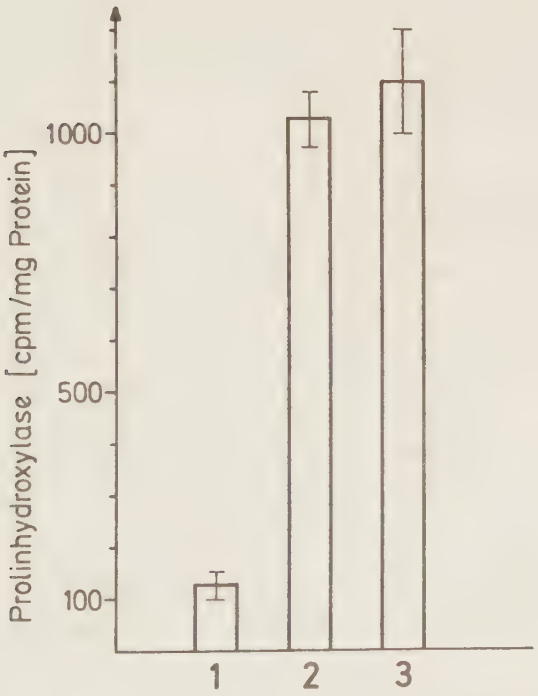
3.6.1. Bestimmung der Prolinhydroxylase

Die Prolinhydroxylase ist ein in der Literatur sehr genau charakterisiertes Enzym, dessen Extraktions- und Bestimmungsmethoden sehr häufig beschrieben sind (91,32) und deshalb ohne größere Schwierigkeiten aus der Literatur übernommen werden konnten.

Da Prolinhydroxylase ein intrazelluläres Enzym ist (s. Abb. 2), wurde es ausschließlich im Zellextrakt erwartet. Bestimmungen im Medium wurden lediglich als Kontrolle durchgeführt. Für eine Prolinhydroxylasebestimmung (s. 2.2.1o.) in Kulturzellen war die Hälfte der aus einer Flasche mit 25 cm^2 Bodenfläche einen Tag nach Konfluenz gewonnenen Zellen ausreichend. Der Zeitpunkt für die Enzymbestimmungen wurde derartig gewählt, um eine hohe

Abb.25

Aktivität der Prolinhydroxylase in Zellkulturen von Myofibroblasten und endothelialen Zellen



Die Aktivität der Prolinhydroxylase wurde nach der unter 2.2.10. beschriebenen Methode bestimmt. Bestimmungen im Medium von Myofibroblasten und endothelialen Zellen (1) wurden als Kontrolle durchgeführt, in den Zellen der Myofibroblastenkulturen (2) und der Kulturen der endothelialen Zellen (3) wurde Enzymaktivität gemessen. Die angegebenen Abweichungen beziehen sich auf Messungen in je 3 verschiedenen Kulturen.

Vergleichbarkeit der Enzymaktivität mit den Biosyntheseprodukten, wie sie in 3.5. beschrieben werden, zu erhalten. Wie in Abb. 25 dargestellt, fand sich in den Medien der Affenleberzellkulturen erwartungsgemäß keine Prolinhydroxylaseaktivität. Beim Vergleich der Enzymaktivitäten in Myofibroblasten und endothelialen Zellen wurde nur eine so wenig höhere Aktivität in den endothelialen Zellen gemessen, daß dieser Unterschied vernachlässigt wurde und gleiche Aktivität der Prolinhydroxylase in beiden Zellen angenommen wurde.

3.6.2. Bestimmung der Lysinoxidase

Die Lysinoxidase, ein extrazelluläres Enzym der Kollagenbiosynthese, ist auf Grund ihrer Hydrophobizität ein sehr schwierig zu bearbeitendes Enzym und, möglicherweise aus diesem Grund, bislang nur von wenigen Autoren ausführlich beschrieben (38).

Die ersten Probleme traten bereits beim Test dieses Enzyms auf: Da es in vivo die Oxidation der Epsilon Aminogruppe des Lysins in der Kollagenfibrille katalysiert (s. Abb. 2), ist eine optimale Enzymaktivität auch in vitro nur mit fibrillärem Kollagen als Substrat messbar. Aus diesem Grund ist eine Renaturierung der Kollagenketten des Substrates (Herstellung s. 2.1.15.) unmittelbar vor dem Enzymtest notwendig (66). Die Abläufe der Substratherstellung und des Enzymtests (s. 2.2.11.) konnten jedoch trotz der Schwierigkeiten relativ schnell aus der Literatur übernommen und im Labor etabliert werden. Größere Probleme warf die Bereitstellung des Enzymmaterials aus den Zellkulturen auf: Seit den ersten Versuchen zur Reinigung der Lysinoxidase vor

1o Jahren scheiterte die genaue Charakterisierung immer wieder an den Schwierigkeiten der quantitativen Solubilisierung des Enzyms. Erst 1974 gelang eine weitgehende Extraktion der Lysinoxidase mit 6 M Harnstoff (92). Diese Extraktionsmethode konnte nach leichten Modifikationen auch in den Zellkulturen angewendet werden. Da jedoch, besonders im Hinblick auf die späteren Versuche mit Humanleberkulturen, von äußerst geringen Zellmengen ausgegangen werden mußte, gestaltete sich die Überführung des extrahierten Enzyms in eine in den Test einsetzbare Form, also in neutralen Puffer, noch einmal schwierig. Hier konnte mit Erfolg eine Mikrodialysemethode mit Hilfe von Membranfiltern (77) eingesetzt werden. Die gesamte Extraktion der Lysinoxidase aus Zellkulturen ist in Abb. 26 in einem Schema zusammengefaßt.

Die Lysinoxidase ist zwar ein extrazelluläres Enzym; dennoch wurde auf Grund der Hydrophobizität des Enzyms die Aktivität assoziiert mit der Zellfraktion vermutet, was sich durch die Kontrolltests im Kulturmedium auch bestätigen ließ. Die aus dem Medium extrahierten Aktivitäten waren vernachlässigbar gering. Jedoch konnten auch in den Zellextrakten in dem getesteten Kulturstadium einen Tag nach Konfluenz keine sehr hohen Aktivitäten gefunden werden, weder in den Myofibroblasten noch in den endothelialen Zellen (Abb. 27).

Abb.26

Extraktion der Lysinoxidaseaktivität aus der Zellkultur

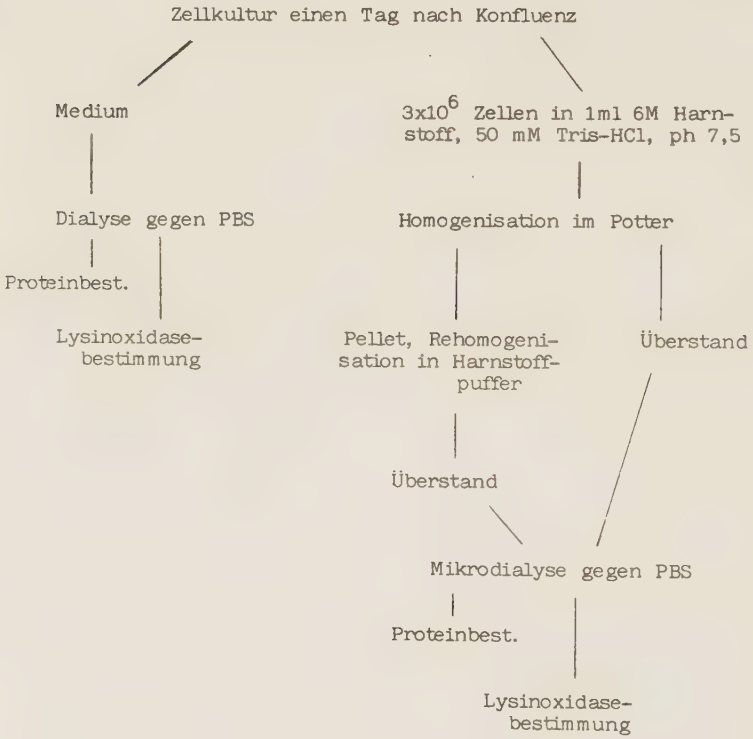
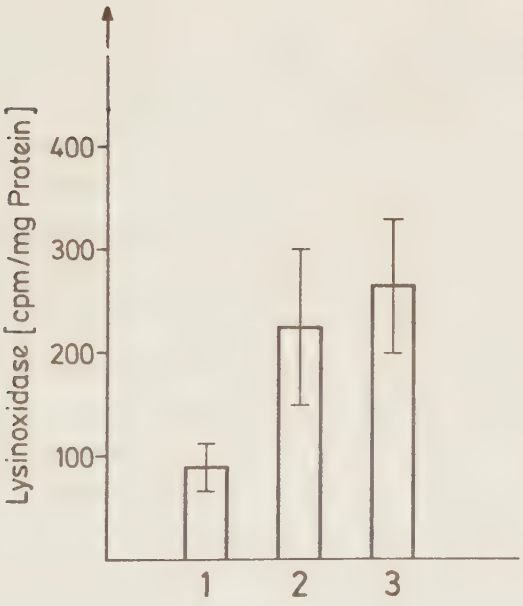


Abb.27

Aktivität der Lysinoxidase in Zellkulturen von Myofibroblasten und endothelialen Zellen



Die Aktivität der Lysinoxidase wurde nach der unter 2.2.11. beschriebenen Methode bestimmt. Vergleichende Messungen wurden in den Medien beider Zellarten (1), im Zellextrakt der Myofibroblasten (2) und im Zellextrakt der endothelialen Zellen (3) durchgeführt. Die angegebenen Abweichungen beziehen sich auf Messungen in je 2 verschiedenen Kulturen.

4. ERGEBNISSE

Teil II: Anwendung der in Teil I an Hand des Tiermodelles beschriebenen Methoden auf gesunde und fibrosierende Humanlebern

4.1. Differenzierung der Problemstellung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Etablierung von Methoden zur Isolierung und Kultivierung gereinigter Leberzellpopulationen sowie die Untersuchung dieser Zellen in Primärkultur auf ihre Fähigkeit zur Biosynthese von Bindegewebsproteinen an Hand eines Tiermodelles der Affenart Macaca fascicularis beschrieben. Es konnten zwei verschiedene Zelltypen in nahezu reiner Form aus Lebern von neugeborenen Tieren kultiviert werden. Eine Zellfraktion wurde "Myofibroblast" genannt,auf Grund ihrer ultrastrukturellen Verwandtschaft mit glatten Muskelzellen und Fibroblasten. Die andere Zellfraktion hatte morphologisch große Ähnlichkeit mit Gefäßendothelzellen. Immunfluoreszenzoptische Kontrollen mit Antikörpern gegen Faktor VIII waren jedoch negativ; aus diesem Grund wurde dieser Zelltyp "endotheliale Zellen" genannt (s. Kap. 3.2.). Im zweiten Teil der Arbeit sollte jetzt die mögliche Bedeutung dieser beiden gereinigten Zellfraktionen bei der Leberfibrose des Menschen untersucht werden.

Zunächst wird die Isolierung dieser Zellen nach morphologischen Kriterien auch aus Humanleber beschrieben werden. Darauffolgend war es jedoch notwendig, das Feld für die biochemischen Untersuchungen abzugrenzen. Bei Betrachtung der Biosyntheseprodukte der Affenleberzellen kann folgendes zusammengefaßt werden:

Die Myofibroblasten synthetisieren in der Primärkultur neben Typ I und Typ III Kollagen noch Typ V Kollagen - im Vergleich zu den anderen Kollagentypen sogar in relativ großen Mengen (s. Abb.17) - Typ IV Kollagen und Fibronektin. Die endothelialen Zellen synthetisieren lediglich Typ I und Typ III Kollagen in bedeutenden Mengen, Typ IV Kollagen konnte im untersuchten Stadium der Zellkultur gar nicht gefunden werden, Typ V Kollagen und Fibronektin nur in, im Vergleich zu den Myofibroblasten,sehr geringen Mengen. Auf die Interpretation der Mengenverteilung der Bindegewebsbiosyntheseprodukte wird bei der Diskussion der Ergebnisse noch näher eingegangen werden. Vorerst soll das Kollagenmuster der beiden Zellarten nur mit einigen immunhistologisch in Affenlebern mit experimenteller Alkoholfibrose gefundenen Daten verglichen werden. Lieber und Hahn (unveröffentlichte Ergebnisse) fanden in fibrotischen Affenlebern immunfluoreszensoptisch eine starke Ausdehnung insbesondere der Typ IV Kollagen und Fibronektin positiven Bereiche gegenüber normalen Affenlebern. Da speziell die Biosynthese von Typ IV Kollagen nur in den Myofibroblasten der neugeborenen Affen gezeigt werden konnte und auch das Fibronektin nur in sehr geringen Mengen in den endothelialen Zellen gefunden wurde, wurde die Arbeitshypothese formuliert, daß den Myofibroblasten die größere Bedeutung bei der Ausprägung der Leberfibrose zukommen könnte. Aus diesem Grunde wird im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit primär die Rolle der Myofibroblasten in gesunder und fibrosierender Humanleber untersucht werden. In einigen vergleichenden Experimenten mit endothelialen Zellen werden die die Arbeitshypothese unterstützende Ergebnisse präsentiert werden.

4.2. Isolierung von Myofibroblasten und endothelialen Zellen aus Humanleber durch Dichtegradientenzentrifugation

Die unter 3.1.2. beschriebene Methode der Dichtegradientenzentrifugation zur Trennung von Zellen aus Lebern von neugeborenen Affen mußte zur Anwendung bei Zellen aus Humanlebern leicht modifiziert werden:

Bei Zentrifugation der Humanleberzellen im 1o bis 6o %igen Percollgradienten wurde zwar im Bereich von 45 % Percoll eine den endothelialen Zellen äquivalente Zellfraktion gefunden, im oberen Bereich des Gradienten wurde jedoch eine sehr breit verschmierte Bande, von 1o bis 25 % Percoll reichend, sichtbar. In der Kultur schien diese Bande zwar vorwiegend Myofibroblasten zu enthalten, jedoch wurden sehr häufig in dieser Fraktion bis zu 5o % der Zellen in Form von Zellaggregaten gefunden, die schlechtes Anwachsverhalten zeigten und auch kaum proliferierten, so daß eine Untersuchung dieser beiden Eigenschaften (s. 3.2.), die gerade im Hinblick auf die Zellen aus fibrosierender Leber sehr wichtig erschien, nahezu ohne Aussagewert war. Bei Betrachtung des Patientengutes fiel auf, daß besonders bei älteren Patienten mit einer mehr oder weniger starken Fettleber die Ausbildung von Zellaggregaten während der Gradientenzentrifugation vorhanden war, während die Desintegration der Zellen bei allen Patienten nach 6o-minütiger Kollagenasebehandlung gleich gut war. Es wurde also versucht, durch die Entfernung von Fett aus der Zellsuspension Fortschritte zu erzielen. Wichtig war es, bei dieser Prozedur möglichst wenige Zellen zu verlieren. Die Wand eines sterilisierten Trichters wurde mit wenig sterilisierter Glaswolle ausgekleidet. Die Zellsuspension wurde vorsichtig über die Glaswolle

in den Trichter laufen gelassen. Eine große Menge Fett (Gelbfärbung der Glaswolle), jedoch nur wenige Zellen, blieben an der Glaswolle haften. Die darauffolgende Dichtegradientenzentrifugation zeigte, daß auf der einen Seite das an der Oberfläche flottierende Fett stark reduziert war, auf der anderen Seite kaum noch Zellaggregate in der obersten Bande zu finden waren.

Die Veränderung der Gradienten auf 2o bis 6o % Percoll brachte eine scharfe Myofibroblastenbande zwischen 2o und 27 % Percoll hervor, die wesentlich leichter zu fraktionieren war als die breit verschmierte Bande im 1o bis 6o %igen Gradienten.

4.3. Morphologische Beschreibung der Myofibroblasten und der endothelialen Zellen aus Humanleber

Die Primärkulturen der Humanleberzellen wurden mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie beschrieben: Zwar zeigten alle Humanleberkulturen ein zum Teil wesentlich langsameres Wachstum als die Zellen der neugeborenen Affen, jedoch wurde bei Erreichen der Konfluenz ein den Affenleberzellen völlig gleichkommendes morphologisches Bild der beiden gereinigten Zellarten gefunden. Abb. 28 zeigt die Morphologie der Zellen aus der Bande von 2o bis 27 % Percoll und der Bande von 42 bis 47 % Percoll in der konfluenten Primärkultur als phasenkontrastmikroskopische Aufnahme. Vergleicht man die Zellen aus Humanleber und Affenleber bezüglich der Lage der reinen Zellfraktionen im Gradienten, der Reinheit dieser Fraktionen (Bande zwischen 2o und 27 % Percoll: 9o bis 1oo % eine Zellart; Bande zwischen 42 und 47 % Percoll: ca. 7o % eine Zellart) und der morphologischen Ausprägung in der

Abb. 28 A

1

2

3

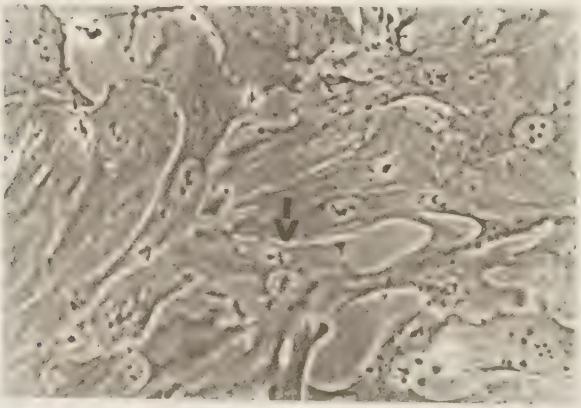


Abb.28 A

Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von Myofibroblasten in Primärkultur

---

1: Aufnahme einer Primärkultur von Leberzellen aus normaler Humanleber, die im Percoll-Dichtegradienten im Bereich von 20 bis 27% bandierten, bei gerade erreichter Konfluenz.
Vergrößerung 320 x

2: Aufnahme einer Primärkultur von Leberzellen aus fibrotischer Humanleber, die im Percoll-Dichtegradienten im Bereich von 20 - 27% bandierten, bei gerade erreichter Konfluenz.
Vergrößerung 160 x

3: Aufnahme einer Primärkultur von Leberzellen neugeborener Affen, die im Percoll-Dichtegradienten im Bereich von 15 - 20% bandierten (s. 3.1.2.), ca. einen Tag vor vollständiger Konfluenz der Zellen als Vergleich.
Vergrößerung 290 x

Die Pfeile (⟶) weisen auf das im Phasenkontrastmikroskop sichtbare typische Merkmal dieses Zelltyps hin, die breiten, unregelmäßigen Zellkontakte (vergl. Abb.5 und 6).

Abb.28 B

Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von endothelialen Zellen in Primärkultur

---

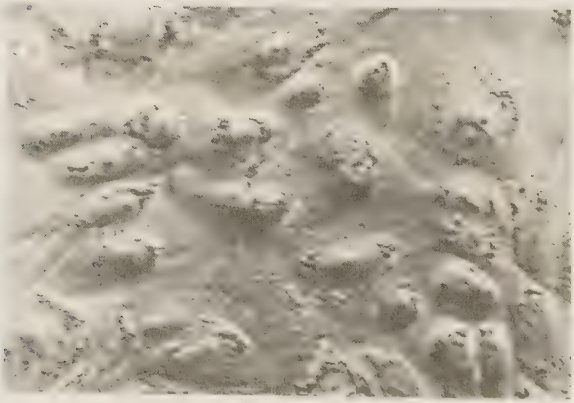
1: Aufnahme einer Primärkultur von Leberzellen aus normaler Humanleber, die im Percoll-Dichtgradienten im Bereich von 42 - 47% bandierten, bei dichter Konfluenz.
Vergrößerung 320 x

2: Aufnahme einer Primärkultur von Leberzellen neugeborener Affen, die im Percoll-Dichtegradienten im Bereich von 40 - 47% bandierten (s. 3.1.2.), bei dichter Konfluenz als Vergleich.
Vergrößerung 320 x

Abb.28 B

1

2



Primärkultur (Abb. 28) ist eine so gute Übereinstimmung der Daten zu verzeichnen, daß die beiden gereinigten Humanleberzellfraktionen ohne weitere elektronenmikroskopische Untersuchung als Myofibroblasten und endotheliale Zellen angesprochen werden können.

4.4. Wachstumsverhalten in der Primärkultur von Myofibroblasten und endothelialen Zellen aus normalen und fibrotischen Humanlebern

In den folgenden Experimenten wurden ausführlich Humanleberzellen von Patienten mit einer gesunden Leber und von Patienten mit einer histologisch gesicherten Leberfibrose miteinander verglichen. Der Grad der Fibrose bei den einzelnen Patienten wird jeweils bei der Beschreibung der verschiedenen Versuche näher angegeben werden.

4.4.1. Adhärens der Humanleberzellen

Wie unter 3.3.1. beschrieben, wurde die Anheftung der Zellen an das Kulturgefäß 45 Stunden nach Kulturbeginn untersucht. Jedoch war nach dieser Zeit in Kulturen aller Normalleberzellen und in Kulturen der endothelialen Zellen aus fibrotischer Leber kaum eine Zelle angeheftet und gar keine Zelle ausgebreitet, während Myofibroblasten aus fibrosierender Leber eine ähnliche Adhärens zeigten wie die Zellen der neugeborenen Affen. In den Kulturen der Normalzellen und der endothelialen Zellen wurde daher erst nach 6 Tagen zum ersten Mal das Medium gewechselt und die angehefteten und ausgebreiteten Zellen gezählt (s. 2.2.2.). In Tab. 4 sind alle auf Adhärensverhalten untersuchten Humanleberzellkulturen aufgeführt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen läßt sich

Tab.4

Adherens von Humanleberzellen in Primärkultur

	Zustand der Leber	Adherente Zellen nach 48 Std. Anzahl	% der Ausgangszahl
Myofibroblasten	normal	$6{,}0 \times 10^4$ *	2
	normal	$5{,}1 \times 10^4$ *	1,7
	normal	$6{,}9 \times 10^4$ *	2,3
	leichte Fibrose	$2{,}8 \times 10^5$	9,6
	Fibrose	$4{,}2 \times 10^5$	14
	Fibrose	$3{,}5 \times 10^5$	11,7
	aktive Zirrhose	$5{,}9 \times 10^5$	19,6
endotheliale Zellen	normal	$5{,}4 \times 10^4$ *	1,8
	normal	$1{,}8 \times 10^4$ *	0,6
	Fibrose	$6{,}3 \times 10^4$ *	2,1
	Fibrose	$7{,}8 \times 10^4$ *	2,6
	aktive Zirrhose	$5{,}1 \times 10^4$ *	1,7

* Die Zellen wurden 6 Tage nach Beginn der Kultur gezählt. Eine zeitlich lineare Anheftung der Zellen wurde willkürlich angenommen und die Zahl der adherenten Zellen wurde auf 48 Std. nach Kulturbeginn zurückgerechnet.

Am Kulturgefäß angeheftete und ausgebreitete Humanleberzellen wurden nach der unter 2.2.2. beschriebenen Methode gezählt. Der jeweilige Zustand der Leber war vor der Kultur histologisch gesichert worden.

wie folgt zusammenfassen: Myofibroblasten aus fibrosierender Leber zeigen in der Primärkultur eine 7 x stärkere Adhärens als Myofibroblasten aus Normalleber.

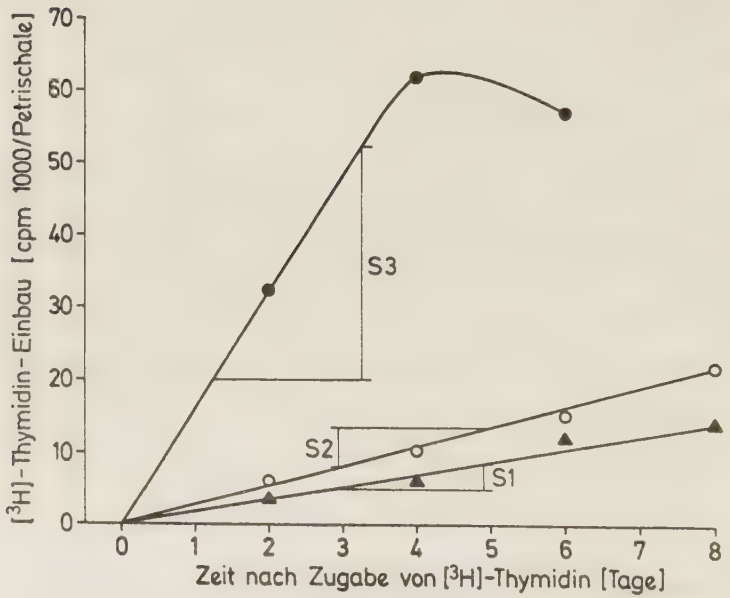
Interessant ist das Ergebnis der Beobachtungen der endothelialen Zellen. Es weist möglicherweise schon auf die Bedeutung der Myofibroblasten bei der Leberfibrose hin. Endotheliale Zellen aus normalen und fibrosierenden Lebern heften sich ungefähr gleich schlecht an das Kulturgefäß an (Tab. 4). Wie unter 3.1.2. und 4.2. beschrieben, sind endotheliale Zellen jedoch meistens bis zu 3o % mit einer anderen Zellart verunreinigt. In den Kulturen von Fibroselebern zeigte sich nun eine starke Adhärens dieser zweiten Zellart, die morphologisch mit den Myofibroblasten identisch war. Nach 6 Tagen fand sich in dieser Fraktion eine gegenüber den endothelialen Zellen mehr als 5 x so große Menge an myofibroblastenähnlichen Zellen, während in der gleichen Fraktion aus Normallebern nach 6 Tagen kaum eine dieser Zellen angeheftet war.

4.4.2. Proliferation der Humanleberzellen

Die Proliferationsgeschwindigkeit der Humanleberzellen wurde lediglich durch ^{3}H -Thymidineinbau in die DNA gemessen, da dieses die genauere Methode war (s. 3.3.2.) und für diesen Versuch nur ein Patient mit gesunder Leber und ein Patient mit mäßiggradiger Leberfibrose zur Verfügung stand. Der Zeitpunkt für die Thymidinzugabe (in Abb. 29 Zeitpunkt o) wurde für die Normalleberzellen nach 6 Tagen Kultur, für die Myofibroblasten aus fibrosierender Leber bereits nach 2 Tagen gewählt, um ähnliche Ausgangszellmengen zu haben (s. Tab. 4). Abb. 29 zeigt das

Abb. 29

Untersuchung der Proliferation von verschiedenen Humanleberzellen durch Einbau von ^{3}H -Thymidin in die DNA



Der Einbau und die Messung von radioaktivem Thymidin in die DNA von Kulturzellen wurde nach der unter 2.2.3. beschriebenen Methode durchgeführt. Die Zeit für die Thymidinzugabe - in der Abbildung Zeitpunkt 0 - war für die Normalleberzellen (Myofibroblasten: o——o ; endotheliale Zellen: ▲——▲) 6 Tage nach Aussaat, für die Myofibroblasten aus fibrotischer Leber (●——●) 48 Std. nach Aussaat.

Ergebnis des Einbauversuchs. Es konnten nur die Myofibroblasten aus normaler und fibrotischer Leber im Vergleich untersucht werden. Die endothelialen Zellen aus fibrotischer Leber waren bei Konfluenz bis auf wenige Kolonien vollständig von myofibrolastenähnlichen Zellen überwachsen und konnten deshalb nicht in die Untersuchung einbezogen werden.

Die Myofibroblasten aus fibrotischer Leber zeigten eine 6 x so schnelle Proliferation gegenüber den Myofibroblasten aus normaler Leber ($S_3 : S_2 = 5,8$). Nach den Beobachtungen im Phasenkontrastmikroskop dürfte für endotheliale Zellen, wenn sie nicht überwachsen würden, eine ähnliche Proliferationsrate für Zellen aus Normalleber (s. Abb. 29) und aus Fibroseleber (ungefähre Zählung der Zellen nach 14 Tagen Kultur) geschätzt werden.

4.5. Analyse der Biosynthese von Bindegewebsproteinen in Primärkulturen von Myofibroblasten isoliert aus normaler und fibrotischer Humanleber

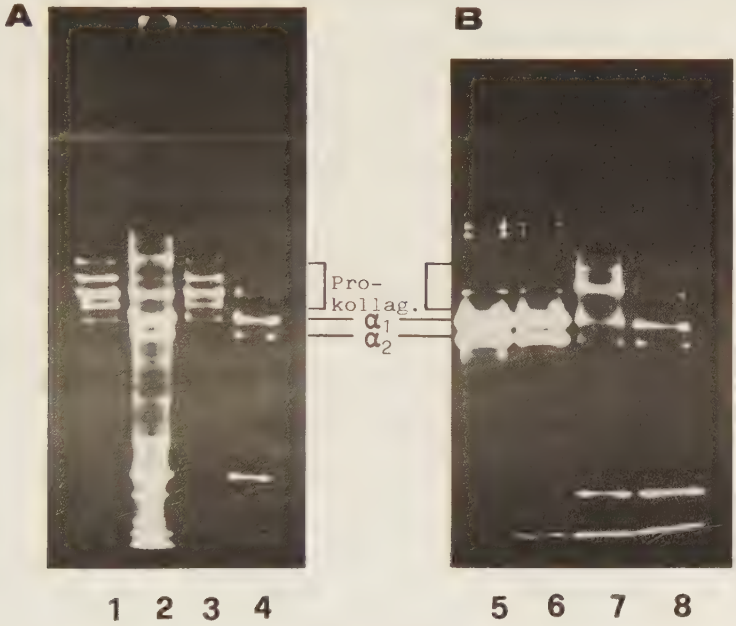
Wie die Wachstumsversuche (s. 4.3.) zeigten, war es sehr wahrscheinlich, daß die Rolle der Myofibroblasten bei der Bindegewebsvermehrung im Rahmen der Leberfibrose beim Menschen von größerer Bedeutung ist als die Rolle der endothelialen Zellen, da nur die Myofibroblasten eine gesteigerte Proliferation zeigten, wenn sie aus fibrotischer Leber isoliert worden waren. Da dieses Ergebnis die unter 4.1. formulierte Arbeitshypothese zur Bedeutung der Myofibroblasten stark unterstützte, wurden im folgenden nur noch einmal die endothelialen Zellen für ein Kontrollexperiment herangezogen. Darüberhinaus sollten dann nur noch die Biosyntheseprodukte der Myofibroblastenkulturen aus normaler und fibrotischer Humanleber qualitativ und quantitativ untersucht werden.

4.5.1. Vergleich der Biosyntheseprodukte aus Myofibroblasten und endothelialen Zellen aus normaler und fibrotischer Leber

Für dieses Experiment wurden gerade konfluente Zellkulturen von Myofibroblasten und endothelialen Zellen aus Normalleber und aus Fibroseleber, also insgesamt 4 verschiedene Kulturen, mit radioaktivem ^{3}H -Prolin markiert und Medien und Zellen getrennt aufgearbeitet (s. 3.4.1.). Der Zeitpunkt für den Beginn des Markierungsexperimentes war bereits extrem unterschiedlich, was die Verschiedenheit der untersuchten Kulturen noch verdeutlicht. Die Myofibroblasten aus fibrotischer Leber konnten bereits 7 Tage nach Aussaat radioaktiv markiert werden, während die Myofibroblasten aus Normalleber erst nach 23 Tagen konfluent waren. Die endothelialen Zellen aus Normalleber konnten sogar erst nach 39 Tagen in das Experiment eingesetzt werden, während die endothelialen Zellen aus fibrotischer Leber schon nach 11 Tagen konfluent waren. Jedoch bestand die letztere Kultur zu diesem Zeitpunkt fast zu 9o % aus myofibroblastenähnlichen Zellen. Um zu überprüfen, ob eine Ähnlichkeit dieser Zellen mit den Myofibroblasten bezüglich des Bindegewebssynthesemusters besteht, wurde auch diese Kultur mit ^{3}H -Prolin markiert. Nach Extraktion der Bindegewebsproteine aus Medium und Zellen (s. 2.1.5.) wurde direkt eine Elektrophorese mit anschließender Fluorographie mit einem Aliquot von je 25 µl Extrakt durchgeführt. Nach 8-tägiger Inkubation des Gels auf Röntgenfilm war im Medium und Zellextrakt der Myofibroblasten aus fibrotischer Leber sowie im Medium und Zellextrakt der von myofibroblastenähnlichen Zellen überwachsenen endothelialen Zellen aus fibrotischer Leber eine kräftige Schwärzung des

Abb.30

Biosyntheseprodukte der Myofibroblasten und endothelialen Zellen aus normaler und fibrotischer Humanleber



Bindegewebsproteine wurden aus Medium und Zellen extrahiert (s. 2.1.8.). Je 30 µl wurden nach Reduktion mit DTE in die Elektrophorese eingesetzt (s. 2.2.4.), die durch Fluorographie (s. 2.2.5.) analysiert wurde.

1 & 2: Medium und Zellextrakt der Myofibroblasten aus fibrotischer Leber

3 & 4: Medium und Zellextrakt der myofibroblastenähnlichen Zellen, die in der Bande der endothelialen Zellen mitisoliert wurden, aus fibrotischer Leber

5 & 6: Medium und Zellextrakt der endothelialen Zellen aus normaler Leber

7 & 8: Medium und Zellextrakt der Myofibroblasten aus normaler Leber

Die Fluorographie der Proben 1-4 wurde 8 Tage auf Röntgenfilm inkubiert, die der Proben 5-8 36 Tage.

Röntgenfilms durch kollagengebundene Radioaktivität zu beobachten. Der Vergleich der Myofibroblasten und myofibroblastenähnlichen Zellen betreffs ihrer Bindegewebsproteinsynthese zeigte ein identisches Kollagenbiosynthesemuster in beiden Zellfraktionen (Abb. 3oA). Zum gleichen Zeitpunkt - nach 8-tägiger Inkubation - war in Medien und Zellextrakten beider Zelltypen, isoliert aus Normalleber, kaum kollagengebundene Radioaktivität nachweisbar. Lediglich im Bereich der α_1 und der α_2-Ketten wurde eine geringe Schwärzung des Röntgenfilms gefunden. Um eine genauere qualitative Aussage über die Kollagenbiosynthese in Normalleberzellkulturen zu erhalten, wurde diese Fluorographie für weitere 28 Tage - also insgesamt für 36 Tage - auf dem Röntgenfilm inkubiert. Abb. 3oB zeigt das Ergebnis dieser Inkubation: Myofibroblasten aus Normalleber zeigen ein qualitativ ähnliches Biosynthesemuster wie Myofibroblasten aus fibrotischer Leber, während das Biosynthesemuster der endothelialen Zellen deutlich unterschiedlich ist, jedoch mit der Biosynthese der endothelialen Zellen aus Affenleber (vergl. Abb. 18) vergleichbar ist. Genauere Analysen der Kollagenbiosynthese werden bei der Quantifizierung der einzelnen Kollagentypen und des Fibronektins gezeigt werden. In diesem Experiment wird lediglich die offensichtlich bedeutende Rolle der Myofibroblasten in der fibrotischen Leber gezeigt, die nicht nur in ihrer Proliferationsrate die endothelialen Zellen weit übertreffen, sondern auch eine mehr als 5 x so starke Kollagenbiosyntheserate (Abb. 3o) in 24 Studen hervorbringen.

4.5.2. Trennung von Bindegewebsproteinen aus Myofibroblastenkulturmedium durch DEAE-Chromatographie

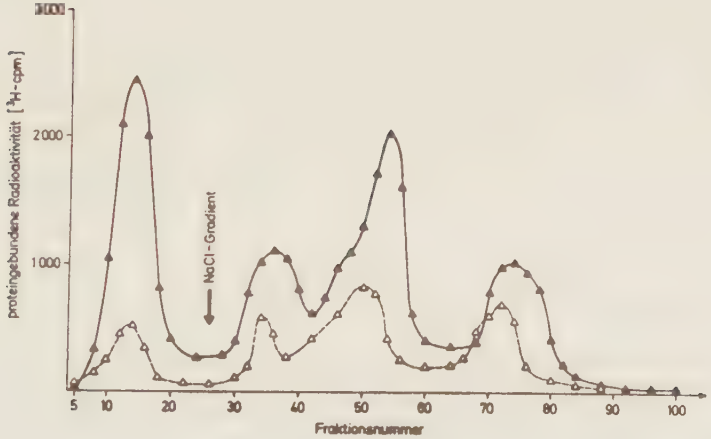
Wie bereits unter 3.4.2. erläutert, wurde die Trennung der in der Zellkultur synthetisierten Kollagenketten durch DEAE-Chromatographie nur im Medium durchgeführt. Dieses Experiment war notwendig, um die Existenz der unterschiedlichen Kollagentypen zu demonstrieren, die sich bei der Analyse durch Elektrophorese der Medien und Zellkulturen ohne weitere Aufarbeitungsschritte teilweise noch überlagerten (Abb. 3o). Die DEAE-Chromatographien folgten exakt der mit den Affenleberzellkulturen etablierten Methodik. Um gleichzeitig einen ersten Anhaltspunkt auch über die quantitativen Verhältnisse der Kollagenbiosynthese in Primärkulturen aus normaler und fibrotischer Leber zu erhalten, wurde die gesamte Aufarbeitung nach folgenden quantitativen Gesichtspunkten durchgeführt:

Ausgehend von je einer konfluenten Zellkultur mit ca. $3ox1o^6$ Zellen wurde nach Markierung mit der gleichen Menge an ^3H -Prolin und Extraktion der Kollagene mit NaCl (s. 2.1.8.) zunächst die NaCl-extrahierbare Radioaktivität sowie der Proteingehalt bestimmt. In beiden Kulturmedien wurde die gleiche Menge an Protein (o,5 - o,6 mg/ml Medium) gemessen, jedoch unterschiedliche Radioaktivität. Im Medium von Normalleberzellkulturen wurden ca. 4o % der eingesetzten Radioaktivität gefunden, im Medium von Kulturen fibrotischer Zellen dagegen mehr als 65 %. Da die verwendete Proteinbestimmungsmethode (78) die Kollagenstrukturen nicht erfaßt, sondern hauptsächlich die globulären Proteine, wurde eine nicht wesentlich unterschiedliche nicht kollagene Proteinsekretion in normalen und fibrotischen Zellen angenommen, jedoch eine recht unterschiedliche Kollagenbiosyntheserate, denn im gemessenen

Extrakt sollte es sich beim größten Anteil der Radioaktivität um kollagenassoziierte Radioaktivität handeln (64). Die darauffolgende DEAE-Chromatographie wurde mit jeweils dem gleichen Volumen an Medium, d.h. mit der gleichen Proteinmenge, durchgeführt. Die im Eluat der Chromatographie wiedergefundene Gesamtradioaktivität war prozentual bei beiden Medien gleich (6o - 65 %), die Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Peaks jedoch unterschiedlich. Die kollagenassoziierten Radioaktivitätspeaks in Medium und Zellkulturen aus fibrotischen Lebern waren sowohl in ihrer Höhe, wie auch in ihrer Mengenverteilung nahezu identisch mit dem Chromatogramm des Affenleberkulturmediums (vergl. Abb. 17 A), während bei Chromatographie des Mediums von Normalleberkulturen die durch NaCl eluierten Peaks natürlich wesentlich weniger Radioaktivität enthielten, da zwar die gleiche Menge an Protein, jedoch eine unterschiedliche Radioaktivitätsmenge auf die Säule aufgetragen worden war. Auffällig war jedoch die relativ zu den anderen Peaks sehr viel geringere Menge an Radioaktivität im Durchlauf dieser Säule (Abb. 31). Die Radioaktivität enthaltenden Peaks der DEAE-Chromatographie wurden vereinigt und durch Elektrophorese auf ihre Kollagenzusammensetzung untersucht (s. 3.4.2.). Von jedem Peak wurde eine prozentual gleiche Menge in die Elektrophorese eingesetzt. Die anschließende Fluorographie wurde 1o Tage inkubiert. Im Fluorogramm der fibrotischen Zellen war zu diesem Zeitpunkt bereits ein gut auswertbares Bandenmuster sichtbar, während die normalen Zellen nur eine einzige schwache Bande im Bereich der α_1-Ketten zeigten. Nach 45 Tagen Inkubation war jedoch auch im Medium der Normalleberkultur ein gut vergleichbares Bandenmuster vorhanden.

Abb. 31

DEAE-Chromatographie der Kulturmedien von Myofibroblasten aus normaler und fibrotischer Humanleber



Je 4 ml dialysiertes Kulturmedium (s. 2.1.8.) von Myofibroblasten aus normaler (△------△) und aus fibrotischer (▲——▲) Humanleber wurden nach der unter 2.1.9. beschriebenen Methode DEAE-chromatographisch aufgetrennt. In Durchlauf und Eluat der Säule wurde die Radioaktivität bestimmt. Die 4 Radioaktivität enthaltenden Peaks wurden für weitere Analysen vereinigt.

Das Ergebnis beider Fluorographien ist in Tab. 5 ausführlich dargestellt. Der Vergleich von Typ I und III Kollagen ist in dieser Aufarbeitung noch mit einem sehr großen Fehler behaftet (3o %), da diese Kollagene nur zu einem geringen Teil in Form ihrer α_1 und α_2-Ketten vorliegen. Vorwiegend werden - besonders im Fall der Zellen aus fibrotischer Leber - Prokollagenketten sowie Intermediärprodukte der Prokollagene, deren N-terminales oder C-terminales Propeptid bereits abgespalten ist, gefunden. In Abb. 3o A ist eine solche Auftrennung besonders deutlich sichtbar (52). Typ IV Kollagen und Typ V dagegen sind besser quantifizierbar; beide Kollagentypen werden von Zellen aus fibrotischer Leber in weit größeren Mengen synthetisiert als von Normalleberzellen. Typ IV Kollagen ist im Medium von Normalleberkulturen mit den hier verwendeten Methoden gar nicht nachweisbar.
Zur DEAE-Chromatographie läßt sich zusammenfassen, daß außer einer gegenüber der Normalleber um mehr als einen Faktor 4 höheren Kollagenbiosyntheserate der Myofibroblasten aus fibrotischer Leber auch das Biosynthesemuster der fibrosierenden Zellen erheblich unterschiedlich ist, genaue quantitative Angaben jedoch erst nach Reinigung der einzelnen Kollagene gemacht werden können.

4.5.3. Bestimmung des Verhältnisses von Typ I zu Typ III Kollagen in Kulturen von Myofibroblasten aus normalen und fibrotischen Humanlebern

Wie bereits ausführlich beschrieben (3.5.2. und 4.5.2.) wurde in allen Zellkulturen aus Affen- und aus Humanlebern zum Zeitpunkt der radioaktiven Markierung eine große Heterogenität

Tab.5

Kollagenbiosynthese in Primärkulturen von Myofibroblasten aus normalen und fibrotischen Humanlebern:
Analyse nach DEAE-Chromatographie

Kollagentyp	Normalleberzellen		Zellen aus fibrotischer Leber	
	Peak Nr.	Menge	Peak Nr.	Menge *
pro I	II	++	II & III	+
Typ I	II	++	II & III	++
pro III	III & IV	++	III & IV	+++
Typ III	III & IV	++	III & IV	+
pro IV	I	n.n.	I	++
Typ V	II	+	II	++
Fibronektin	IV	n.n.	IV	n.n.

* Es ist zu berücksichtigen, daß im Vergleich zu den Normalleberzellen die 3-fache Menge an Kollagen in 24 Std. synthetisiert wird (s. Text). Die angegebenen Mengen sind also mit 3 zu multiplizieren.

Jeweils die gleiche Menge mit 0,5 M NaCl extrahiertes Kulturmedium von Myofibroblasten aus normaler und fibrotischer Humanleber wurde säulenchromatographisch an DEAE-Cellulose aufgetrennt. Jeweils 4 Radioaktivität enthaltende Peaks wurden vereinigt, dialysiert und lyophylisiert und durch Elektrophorese mit anschließender Fluorographie analysiert. Die Fluorogramme der Normalleberaufarbeitung wurden 30 Tage auf Röntgenfilm inkubiert, die der fibrotischen Lebern 10 Tage. Danach wurde eine vergleichbare Bandenintensität gefunden. Die Mengenverhältnisse wurden durch Densitometrie der Röntgenfilme ermittelt. Die quantitativen Angaben sind mit einem Fehler von über 30% behaftet, da sehr eng beieinander liegende Banden (z.B. proα_1(I) und proα_1 (III)) nicht auflösbar waren.
n.n. = nicht nachweisbar

verschiedener Biosynthesestufen (s. Abb. 2) des Typ I und Typ III Kollagens vorgefunden, so daß ein Pepsinabbau durchgeführt werden mußte, um alle Synthesestufen in einer Fraktion erfassen zu können und dadurch eine genaue Quantifizierung möglich zu machen. In Abb. 21 ist der genaue Aufarbeitungsgang zur Reinigung von Typ I und III Kollagenen, wie er an Hand der Affenleberzellkulturen ausgearbeitet wurde, dargestellt. Diese Methode wurde exakt auf die Humanleberkulturen angewendet. Die Trennung von Typ I und III Kollagenen konnte im etwa gleichen Verhältnis (leichte Verunreinigung der Typ I Fraktion durch Typ III) reproduziert werden. Im Gegensatz zu den in den vorigen Kapiteln beschriebenen unterschiedlichen Inkubationszeiten der Fluorogramme bei Kulturen von normalen und fibrotischen Leberzellen wurde im vorliegenden Experiment eine gleiche mittlere Inkubationszeit von 17 Tagen für alle Fraktionen gewählt und anschließend durch Densitometrie analysiert. Abb. 32 zeigt die Densitogramme von Typ I und III Kollagen aus Medium und Zellextrakt der Myofibroblasten aus normaler und fibrotischer Humanleber. Durch Flächenintegration der α_1 und α_2-Peaks der verschiedenen Fraktionen wurde das Verhältnis von Typ I zu Typ III Kollagen berechnet, wie es in Tab. 6 zusammengefaßt ist. Typ I Kollagen trat in den Normalleberzellen im Vergleich zum Typ III in doppelter Menge auf, während sich das Verhältnis in den Zellkulturen der fibrotischen Lebern umgekehrt darstellte, Typ III Kollagen war in doppelter Menge des Typ I Kollagens vorhanden.

Abb.32

Densitometrische Analyse der Fluorogramme von gereinigtem Typ I und III Kollagen aus Humanleberkulturen

Aus je 3,75 ml Medium und 2,5 ml Zellextrakt (s. 2.1.8.) einer Myofibroblastenkultur aus normaler (I) und zweier aus fibrotischer (II) Humanleber wurde nach dem in Abb.21 dargestellten Schema Typ I und Typ III Kollagen fraktioniert. Die Präcipitate wurden in 50 µl Elektrophoresepuffer aufgenommen, 20 µL davon wurden nach Reduktion mit DTE in die Elektrophorese eingesetzt und nach 2.2.5. und 2.2.7. analysiert.

A: Typ I Kollagen aus Medium **B:** Typ I Kollagen aus Zellex.
C: Typ III Kollagen aus Medium **D:** Typ III Kollagen aus Zellextrakt

Tab.6

Biosynthese von Typ I und Typ III Kollagen in Primärkulturen von Myofibroblasten aus normaler und fibrotischer Humanleber

		Typ I (in % von Typ I+III Kollagen)	Typ III	Typ I / Typ III
normale Leber*	Medium	49	35	
	Zellen	12	4	
	Gesamt	61	39	1,56
fibrotische Leber*	Medium	27	54	
	Zellen	5	13	
	Gesamt	32	68	0.47

Die Zellkulturen wurden nach dem in Abb.21 dargestellten Schema aufgearbeitet und wie im Text unter 3.5.2. beschrieben quantitativ ausgewertet.

* Die angegebenen Werte beziehen sich auf Versuche mit Leber von 1 Patienten ohne irgendeine Lebererkrankung (Normalpatient) und 2 Patienten mit einer mäßiggradigen Leberfibrose.

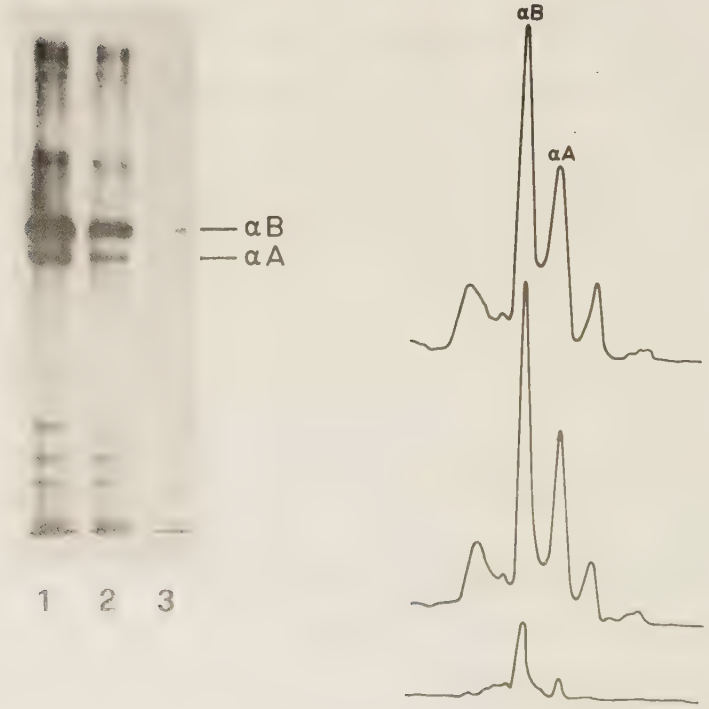
4.5.4. Vergleichende Bestimmung von Typ V Kollagen in Myofibroblastenkulturen aus normalen und fibrotischen Humanlebern

Typ V Kollagen wurde,wie schon bei den Affenleberzellkulturen, (s. 3.4.3.) nach einem Pepsinabbau getrennt von den anderen Kollagenen gereinigt, da es stärker noch als bei den Affenleberkulturen in der Elektrophorese des Kulturmediums - auch nach DEAE-Chromatographie - durch Intermediärprodukte der Typ I und III Kollagenbiosynthese überlagert wurde (Abb. 3o). Zwar konnte Typ V Kollagen im unreduzierten Zustand scheinbar leicht quantifiziert werden, jedoch stellte sich bei der Reinigung heraus, daß größere Mengen an Typ V Kollagen bei der Ionenaustauschchromatographie verloren gingen.

Abb. 33 zeigt die Elektrophorese von gereinigtem Typ V Kollagen aus Myofibroblastenkulturmedium von normaler Leber und von fibrotischer Leber, sowie die densitometrische Analyse der Fluorogramme. Typ V Kollagen wurde,wie bei den Affenleberkulturen,nur im Medium gefunden, nicht in den Zellextrakten. Aus dem Medium der Myofibroblasten, isoliert aus fibrotischer Leber, konnte - bezogen auf die gleiche Ausgangszellzahl - mehr als die 5-fache Menge (Faktor 5,15) an Typ V Kollagen extrahiert werden, als aus dem Medium der Myofibroblasten isoliert aus Normalleber. Bei den Berechnungen mußte berücksichtigt werden, daß die αB- und αA-Ketten, wenn sie aus einer kleinen Menge an Gesamtkollagen gereinigt worden waren, wie es bei den Normalleberkulturen der Fall war, nicht mehr im Verhältnis 2:1 isoliert werden konnten. Es wurde eine relativ zu kleine αA-Fraktion gefunden (s. Abb. 33). Die Menge dieser Fraktion wurde rechnerisch korrigiert.

Abb.33

Fluorographie und densitometrische Analyse von Typ V Kollagen aus Humanleberzellkulturen



Typ V wurde aus 2 ml Myofibroblastenkulturmedium aus fibrotischer (2) und normaler (3) Humanleber gereinigt, wie unter 2.1.12. beschrieben, und nach der Elektrophorese (s. 2.2.4.) durch Fluorographie (s. 2.2.5.) und Densitometrie (s. 2.2.7.) analysiert. In Kanal 1 ist Typ V Kollagen aus Affenleber (vergl. Abb.23) als Kontrolle dargestellt.

4.5.5. Vergleichende Quantifizierung von Fibronektin in Myofibroblasten aus normalen und fibrotischen Humanlebern nach Immunpräcipitation

Fibronektin konnte im Gegensatz zu den Affenleberkulturen in allen bis hierhin durchgeführten Aufarbeitungsgängen von Humanleberzellkulturen nicht gefunden werden. Weder in der Elektrophorese des Gesamtmediums oder Zellextraktes, noch in einer der durch DEAE-Chromatographie gewonnenen Fraktionen konnte eine entsprechende Bande im Bereich von 22o.ooo Dalton (nach Reduktion mit DTE) lokalisiert werden. Es wurde zunächst vermutet, daß das Fibronektion - falls es von Myofibroblasten aus Humanleber überhaupt synthetisiert wird - mit o,3 M NaCl nicht von der DEAE-Säule (s. 4.5.2.) eluiert worden war. Aus diesem Grund wurde die Säule noch einmal mit 1 M NaCl nacheluiert. Es wurde ein sehr scharfer Radioaktivitätspeak gewonnen, der fast 2o % der aufgetragenen Radioaktivität enthielt. In der Elektrophorese dieser Fraktion war jedoch außer einer ganz geringen Menge an α_1-Ketten keinerlei eindeutig identifizierbare kollagen- oder fibronektinassoziierte Radioaktivität zu finden.

Trotz dieser bis hierhin negativen Ergebnisse wurde noch einmal die Methode der Immunpräcipitation von Fibronektin direkt aus dem Gesamtmedium herangezogen (s. 3.5.4.). Abb. 34 zeigt das Ergebnis der Präcipitation mit anti-Fibronektin aus dem Kulturmedium und dem Zellextrakt der Humanleberzellen im Vergleich mit den Affenleberzellen. Lediglich die Fraktion des Affenleberkulturmediums zeigt die erwartete Fibronektinbande im Bereich von 22o.ooo Dalton, korrespondierend mit der Markerfibronektinbande aus Humanplasma. Weder im Kulturmedium noch im Zellextrakt der

Abb.34

Immunpräcipitation von Fibronektin aus Myofibroblastenkulturen aus normaler und fibrotischer Humanleber

Immunpräcipitationen mit anti-Fibronektin wurden direkt aus Medien und Zellextrakten nach der unter 2.2.8. beschriebenen Methode durchgeführt.

1.& 4: Präcipitat aus Medium und Zellextrakt von Affenlebermyofibroblasten als Vergleich

2 & 5: Präcipitat aus Medium und Zellextrakt von Normalleberzellen

3 & 6: Präcipitat aus Medium und Zellextrakt von Zellen aus fibrotischer Leber

S: Fibronektin aus Humanplasma als Standard (➡)

normalen Humanleberzellen war irgendeine fibronektinähnliche Bande zu finden. Dieses Ergebnis konnte an 3 verschiedenen Normalpatienten reproduziert werden. Zunächst erstaunlich erschien das Ergebnis der Immunpräcipitation im Kulturmedium der Zellen aus fibrotischer Leber. Hier wurden 4 verschiedene Banden im Molekulargewichtsbereich zwischen 22o.ooo und 1oo.ooo Dalton, ebenfalls reproduzierbar an 2 Patienten mit einer Leberfibrose, präcipitiert. Neueste Daten über die proteasespaltbaren Untereinheiten von Fibronektin (93) lassen jedoch mittlerweile eine Erklärung für dieses zunächst merkwürdige Ergebnis finden.

Auf Grund des in den Kulturmedien der fibrotischen Zellen höchstwahrscheinlich in Form von Spaltprodukten vorliegenden Fibronektins war eine Quantifizierung durch Densitometrie der Fluorogramme nicht mehr möglich, im vorliegenden Fall jedoch auch nicht notwendig, da im Kulturmedium der Normalleberzellen gar kein Fibronektin gefunden worden war.

4.5.6. Vergleichende Quantifizierung von Typ IV Kollagen in Myofibroblasten aus normalen und fibrotischen Humanlebern nach Immunpräcipitation

Typ IV Kollagen, bzw. Typ IV Prokollagen, wird im nativen Zustand als Protein beschrieben, das nicht an DEAE-Cellulose bindet (64,72). Bei den Affenleberzellen (s. 3.5.1.) sowie bei den fibrotischen Humanleberzellen (s. 4.5.2.) war auch, korrespondierend mit diesen Ergebnissen, in der Elektrophorese des Durchlaufs der DEAE-Chromatographie des Kulturmediums eine Doppelbande im Bereich von 18o.ooo Dalton lokalisiert worden. Kleine

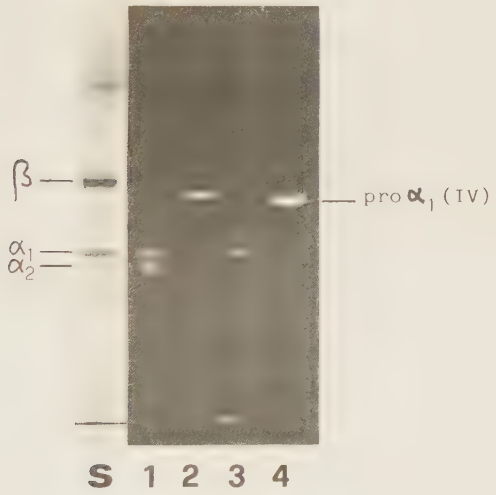
Reste dieser Doppelbande wurden noch im ersten Peak des NaCl-Eluates (ca. o - o,1 M NaCl) gefunden (s. Abb. 18). Weder im Durchlauf der DEAE-Säule des Kulturmediums der Normalleberzellen noch im ersten Peak des NaCl-Eluates war ein entsprechendes Bandenmuster in der Elektrophorese sichtbar. Dieses Ergebnis korrelierte zwar mit dem Elutionsprofil der DEAE-Chromatographie des Mediums der Normalleberzellen (Abb. 31), in dem nur ein relativ sehr kleiner Radioaktivitätspeak als Durchlauf gewonnen wurde, jedoch konnte nicht ausgeschlossen werden, daß eventuell vorhandene geringe Mengen an Typ IV Prokollagen auf der Säule verlorengehen.

Aus diesem Grund wurde noch einmal die schon beim Fibronektin erfolgreich angewendete Methode der Immunpräcipitation herangezogen. Da keine Antikörper gegen Typ IV Kollagen, wie beim Fibronektin, käuflich waren, wurde eine laboreigene Ziege mit Typ IV Kollagen immunisiert und versucht, den Antikörper aus dem Serum anzureichern.

Typ IV Kollagen, aus einem Maustumor gereinigt (64), wurde freundlicherweise von Dr. R. Timpl, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, für die Immunisierung zur Verfügung gestellt. Nach der fünften Immunisierung wurde eine positive Immunantwort im Serum der Ziege durch Immunfluoreszenzuntersuchungen festgestellt (immunfluoreszenzoptische Untersuchungen von Dr. E. Hahn, Med. Univ. Klinik, Marburg). Da durch die zahlreichen Immunisierungen kein Typ IV Kollagen mehr verfügbar war, mußte auf eine spezifische Reinigung des Antikörpers durch Affinitätschromatographie an einem Typ IV-gekuppelten Trägergel verzichtet werden. Eine neue Reinigung von Typ IV Kollagen zu diesem Zweck war aus technischen Gründen im Rahmen

Abb.35

Immunpräcipitation von Typ IV Prokollagen aus Myofibroblastenkulturmedium direkt und aus dem Durchlauf der DEAE-Chromatographie des Mediums



Immunpräcipitationen mit Antikörpern gegen Typ IV Prokollagen, hergestellt nach 2.1.13., wurden nach der unter 2.2.8. beschriebenen Methode durchgeführt.

1: Präcipitat aus Medium von Nomallebermyofibroblasten
2: Präcipitat aus Medium von Myofibroblasten aus fibrotischer Leber
3: Präcipitat aus dem Durchlauf der DEAE-Chromatographie von Nomallebermyofibroblastenkulturmedium
4: Präcipitat aus dem Durchlauf der DEAE-Chromatographie von Myofibroblastenkulturmedium aus fibrotischer Leber
S: Typ I Kollagen aus Haut als Standard (Proteinfärbung)

der vorliegenden Arbeit nicht durchführbar. Deshalb wurde auf eine unspezifische Anreicherung des Antikörpers, wie unter 2.1.13. beschrieben, ausgewichen.

Wie Abb. 35 zeigt, konnte mit diesem Antikörper aus Medium sowohl von Normalleberkulturen, als auch von Kulturen fibrotischer Zellen ein Protein präcipitiert werden, das in der Elektrophorese eine Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 18o.ooo Dalton bildete. Aus Medium von Fibrosezellen wurde ausschließlich dieses eine Protein präcipitiert, während im Medium von Normalleberzellen noch zusätzlich α_1 und α_2-Ketten im Immunpräcipitat gefunden wurden. Beim densitometrischen Vergleich der Fluorogramme dieser Elektrophoresen wurde eine mehr als 4 x (Faktor 4,16) stärkere Intensität der möglichen Typ IV Bande in den fibrotischen Zellen gegenüber den Zellen aus Normalleber festgestellt. Auf Grund der oben beschriebenen Reinigung des Antikörpers ist dieses Ergebnis jedoch mit einiger Vorsicht zu betrachten, zumal auch nur eine einzelne Bande und nicht die für Prokollagen Typ IV beschriebene Doppelbande (94) immunpräcipitiert werden konnte. Eine genauere Bewertung dieses Experimentes wird noch in der abschließenden Diskussion im Vergleich mit den anderen Ergebnissen zum Typ IV Kollagen versucht werden.

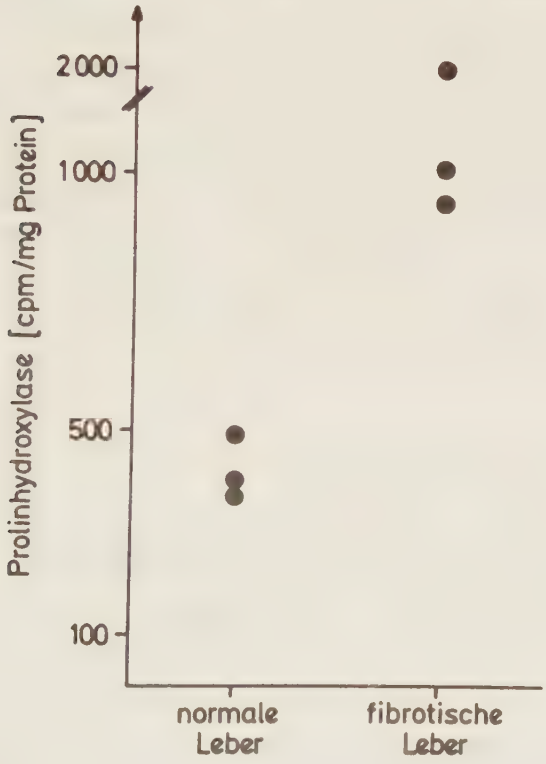
4.6. Bestimmung von kollagensynthetisierenden Enzymen in Myofibroblasten aus normaler und fibrotischer Humanleber

4.6.1. Bestimmung der Prolinhydroxylase

Die an Hand der Affenleberkulturen ausgearbeitete Bestimmungsmethode der Prolinhydroxylase (s. 3.6.1.) konnte ohne Modifika-

Abb.38

Aktivität der Prolinhydroxylase in Zellkulturen von Myofibroblasten aus normaler und fibrotischer Humanleber



Die Aktivität der Prolinhydroxylase wurde nach der unter 2.2.10. beschriebenen Methode ausschließlich im Zellextrakt der Kulturen bestimmt. Die Messungen wurden in Zellen von jeweils 3 Patienten ohne und mit fibrotischen Leberveränderungen durchgeführt.

tion auf die Humanleberzellkulturen angewendet werden. Die Enzymbestimmung wurde lediglich im Zellextrakt durchgeführt, da im Medium schon bei den Affenleberkulturen erwartungsgemäß keine Aktivität gefunden werden konnte.

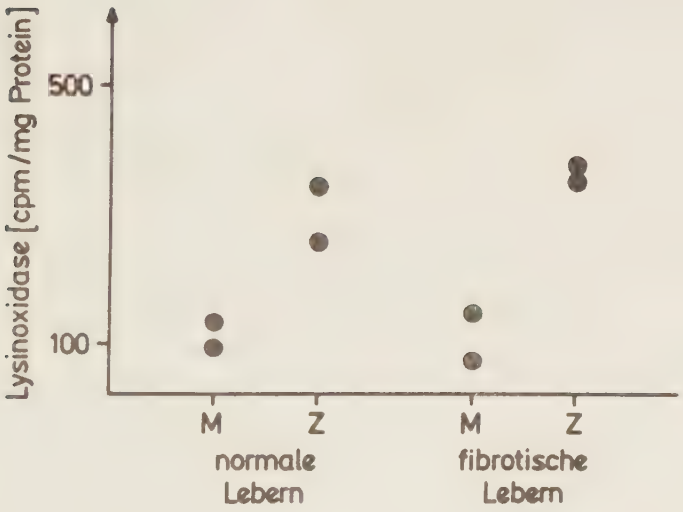
Prolinhydroxalaseaktivität wurde vergleichend in Kulturen von Leberzellen von 3 Normalpatienten und von 3 Patienten mit einer histologisch gesicherten Leberfibrose bestimmt. Von den Zellen der Fibrosepatienten wurde in allen 3 Fällen eine um mehr als einen Faktor 2 höhere Enzymaktivität ausgeschüttet als von den Zellen der Patienten mit gesunder Leber (Abb. 36). Die gegenüber den Normalwerten stark variierenden Enzymaktivitäten in den verschiedenen Kulturen der fibrotischen Lebern sind möglicherweise auf den unterschiedlichen Grad der Fibrose bei den einzelnen Patienten zurückzuführen.

4.6.2. Bestimmung der Lysinoxidase

Auch die Bestimmung der Lysinoxidaseaktivität konnte exakt nach der unter 3.6.2. für die Affenleberkulturen beschriebenen Methodik durchgeführt werden. Es wurden Aktivitäten in Medien und Zellextrakten von Myofibroblastenkulturen aus Lebern von 2 Normalpatienten und 2 Fibrosepatienten miteinander verglichen (Abb. 37). In keiner der getesteten Fraktionen konnte eine bedeutende Erhöhung der Lysinoxidaseaktivität gemessen werden. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis stand ein Befund im Plasma der 4 genannten Patienten (Krauledat, PB und Hahn, EG, unveröffentlichte Ergebnisse): Im Plasma der Patienten mit einer aktiven Leberfibrose war gegenüber dem Plasma der Normalpatienten eine Steigerung der Lysinoxidaseaktivität gefunden worden. Diese Messungen standen im Zusammenhang mit einer Reihe von Bestimmun-

Abb.37

Aktivität der Lysinoxidase in Zellkulturen von Myofibroblasten aus normaler und fibrotischer Humanleber



Die Ativität der Lysinoxidase wurde nach der unter 2.2.11. beschriebenen Methode im Zellextrakt (Z) und im Medium (M) der Kulturen bestimmt. Die Messungen wurden in Zellen von je 2 Patienten ohne und mit einer mäßiggradigen Leberfibrose durchgeführt.

gen im Plasma von Patienten mit Leberfibrose oder -zirrhose, in der eine signifikant erhöhte Lysinoxidasaktivität gegenüber den Normalpatienten festgestellt worden war. Auf den Vergleich dieser Ergebnisse auch mit den Literaturdaten wird in der abschließenden Diskussion noch eingegangen werden.

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage nach der Regulation der pathologisch gesteigerten Bindegewebsbiosynthese bei der Leberfibrose des Menschen einer Klärung näher gebracht werden. In der Einleitung wurde die Regulationshypothese entwickelt (s. 2.2.), nach der die Bindegewebsvermehrung bei der Leberfibrose auf ein Zusammenspiel von verstärkter Proliferation der bindegewebssynthetisierenden Zellen mit einer erhöhten Bindegewebsbiosyntheserate der einzelnen Zelle zurückzuführen ist.

Diese Arbeitshypothese erforderte zunächst einmal die Identifizierung der Zelle, bzw. der Zellen der Leber, die zur Bindegewebsbiosynthese befähigt sind.

5.1. Isolierung und morphologische Charakterisierung von Myofibroblasten und endothelialen Zellen

Die Isolierung dieser zwei Zellfraktionen wurde an Hand von Leberzellen neugeborener Affen etabliert. Die genaue morphologische Charakterisierung der Zellen, vor allem durch Elektronenmikroskopie, wurde ausschließlich für Affenleberzellen durchgeführt. Es konnten jedoch gute Hinweise gefunden werden, daß diese Charakterisierung ohne weiteres auf Humanleberzellen übertragen werden kann. Zunächst soll jedoch die Isolierung und Charakterisierung der Affenleberzellen diskutiert werden:

In älteren experimentellen Arbeiten zur Untersuchung von Leberfunktionen wurde bei der Diskussion der dafür verantwortlichen Leberzellen vorwiegend vom Hepatozyten gesprochen. Später ging man auf eine Unterteilung in Parenchymzellen, worunter die Hepato-

zyten verstanden werden, und nicht parenchymatische Zellen, unter die - mit Ausnahme der Blutzellen - alle restlichen Zellen fallen, über. In den letzten Jahren ist besonders diesen nicht-hepatozytären Zellen größere Aufmerksamkeit geschenkt worden, d.h. neben der morphologischen Beschreibung wurden auch funktionelle Untersuchungen gemacht (83,95,96,97). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde auch bereits die Potenz bestimmter Zellen zu einer bedeutenden Bindegewebsproteinbiosynthese diskutiert. Wisse (83) schlug vor, daß möglicherweise die Fettzellen - oder auch Ito-Zellen - für die Kollagenbiosynthese in der Leber verantwortlich sein könnten. Wie in der Einleitung ausgeführt, fehlen jedoch gezielte Untersuchungen zu diesem Problem völlig. Die zitierten Arbeiten erbrachten vielmehr die methodischen Hinweise zur Isolierung reiner Zellfraktionen. Wisse und Mitarbeitern (57,96) gelang die Reinigung insbesondere von Kupfferzellen, Endothelzellen und Fettzellen aus perfundierter Leber durch Dichtegradientenzentrifugation mit Metrizamidgradienten. Da die Zellen jedoch nach der Trennung in Kultur genommen werden sollten, empfahl sich die Verwendung von einer osmotisch und chemisch inerten Gradientensubstanz (s. 3.1.2.). Percoll erschien nach den bisherigen Literaturdaten zu diesem Zweck besonders geeignet (81,82). Pertoft et al. (82) beschrieben die Zentrifugation von Rattenleberzellen in diesem Gradientenmedium, jedoch nicht unter dem Aspekt einer Reinigung bestimmter Zellfraktionen, sondern zur Überprüfung der Vitalität der Zellen.

Ausgehend von den methodischen Ansätzen von Wisse und Mitarbeitern (57) und Pertoft et al. (82) wurde in der vorliegenden Arbeit eine neue Methode zur Isolierung von reinen Zellfraktionen

mit hoher Vitalität entwickelt. Die Methode ist in Kap. 3.1. ausführlich beschrieben. Durch Sedimentation wurde zunächst aus der Gesamtmenge der desintegrierten Leberzellen ein großer Teil der Hepatozyten abgetrennt. Die restlichen Hepatozyten fanden sich im Pellet des Dichtegradienten. Die nicht-hepatozytären Zellen waren über den ganzen Gradienten verteilt. Die erste Charakterisierung der Zellen nach der Isolierung wurde durch Phasenkontrastmikroskopie der Monolayerkulturen durchgeführt. Hierdurch konnten zwei weitgehend reine Zellfraktionen identifiziert werden. Die größere Fraktion (Myofibroblasten) enthielt ca. 1o % der desintegrierten Leberzellen, die kleinere Zellfraktion ca. 3,5 % (endotheliale Zellen). Es ist aber zu berücksichtigen, daß eine Aussage über die Reinheit der Zellpopulationen erst nach dem ersten Mediumwechsel, also nachdem eine bestimmte Anzahl von Zellen angewachsen war, gemacht werden konnte. Darüberhinaus konnten bestimmte morphologische Kriterien erst bei ausgebreiteten Zellen (s. Abb. 13) festgelegt werden, da zwar angewachsene aber nicht ausgebreitete Zellen im Mikroskop nur als diffuse Masse ohne Struktur erschienen. Hieraus geht hervor, daß nicht definitiv festzulegen ist, ob eine in dem beobachteten Maße reine Zellfraktion bereits durch die Gradientenzentrifugation gewonnen wird, oder ob die Zellen durch die gewählten Wachstumsbedingungen einer weiteren Auslese unterworfen werden, so daß auch die quantitiativen Angaben nur eine ungefähre Vorstellung über die Mengenverhältnisse der einzelnen Zellarten in der Leber geben können. Die späteren Untersuchungen ließen die Ausleese durch unterschiedliches Anwachsen wahrscheinlicher erscheinen. Möglicherweise ist die Ausleese auf

eine bevorzugte Adherens von kollagensynthetisierenden Zellen zurückzuführen. Kollagen oder auch andere Bindegewebsproteine, wie z.B. das Fibronektin, werden häufig zum Beschichten von Kulturgefäßen verwendet, um ein leichteres Anwachsen der Zellen zu ermöglichen, da diese Substanzen als Ersatzzellmatrix fungieren (98,99,1oo). Zellen, die selbst Kollagen synthetisieren, sollte nach dem gleichen Mechanismus eine Anheftung an das Kulturgefäß erleichtert sein, wie auch die leichte Kultivierbarkeit von Fibroblasten zeigt.

Zunächst wurden jedoch die zwei reinen, bei verschiedenen Dichten bandierenden Zellfraktionen in der konfluenten Zellkultur phasenkontrastmikroskopisch beschrieben. Die in Kap. 3.2.1. ausführlich dargestellte unterschiedliche morphologische Ausprägung der Zellen als polygonale Zelle mit breiten, gelappten Zellkontakten und einem stark granuliert erscheinenden Cytoplasma auf der einen Seite, als spindelförmige Zelle mit glatten Zellkontakten und einem vergleichsweise klaren Cytoplasma auf der anderen Seite, führte zunächst zu der Annahme, daß es sich um zwei völlig verschiedene Zellarten handelt. Die bei einer höheren Dichte bandierende Zellfraktion hatte im phasenkontrastmikroskopischen Bild eine große Ähnlichkeit mit den aus Affenvenen isolierten Gefäßendothelzellen (s. 3.1.1.). Jedoch zeigten die immunfluoreszenzoptischen Daten zur Reaktion dieser Zellart mit Faktor VIII, einem unbedingten Marker für typische Endothelzellen, daß in der Affenleberkultur lediglich eine den Endothelzellen morphologisch ähnliche Zellart vorlag, die dann entsprechend diesen Befunden endotheliale Zelle genannt wurde. Der Name Myofibroblast für die andere reine Zellart, die in

einem weniger dichten Bereich des Gradienten bandierte, wurde als Arbeitsname gewählt, obwohl der Vergleich dieser Zelle mit glatten Muskelzellen und Hautfibroblasten von neugeborenen Affen im Phasenkontrastmikroskop deutlich unterschiedlich war. Auf die Gründe, die dennoch zu diesem Arbeitsnamen geführt haben, wird im folgenden noch näher eingegangen werden.

Als nächstes soll erst einmal die Ultrastruktur dieser Zellen diskutiert werden. Im Elektronenmikroskop nämlich zeigte sich, daß trotz der unterschiedlichen Dichte und der andersartigen phasenkontrastmikroskopischen Morphologie der beiden Zellarten zumindestens in der Monolayerkultur keine prinzipiellen ultrastrukturellen Unterschiede zu finden waren (s. 3.2.2.). Die verschiedene Dichte der beiden Zellfraktionen ist dennoch leicht zu erklären: Die Zellen besitzen eine unterschiedliche Größe, vor allem unterschiedlich große Cytoplasmenanteile. Aus diesem Grund ist eine relativ verschiedene Menge von Fetttröpfchen und Cytoskelettonproteinen, die einen hohen Einfluß auf das Verhalten der Zellen im Dichtegradienten haben, in den beiden Zellarten vorhanden. Das unterschiedlich ausgeprägte Cytoskelett muß auch für die im Phasenkontrastmikroskop sichtbare verschiedene morphologische Gestalt der Zellen verantwortlich sein.

Als sehr wichtiger ultrastruktureller Aspekt für die weitere Untersuchung dieser Zellen erschien die Beobachtung, daß im Interzellularraum beider Zellen Kollagenfibrillen gefunden werden konnten (s. Abb.11). Darüberhinaus war in den Myofibroblasten eine stärkere sekretorische Aktivität als in den endothelialen Zellen sichtbar. Zum Ersten war also eine prinzipielle Potenz

beider Zellfraktionen zur Kollagenbiosynthese bereits gesichert, so daß biochemische Untersuchungen unter der zu Beginn formulierten Arbeitshypothese sinnvoll erschienen; zum Zweiten waren zwar keine grundlegenden morphologischen Unterschiede - wie etwa bei Epithel- und Endothelzelle - zwischen den beiden Zellfraktionen gefunden worden, jedoch konnten differenzierte Stoffwechselaktivitäten als gesichert angesehen werden, so daß durch den Vergleich der Biosyntheseleistungen der Zellen ein grundlegender Fortschritt zu erwarten war.

Die Charakterisierung der Humanleberzellen im zweiten Teil der Arbeit erfolgte lediglich durch Phasenkontrastmikroskopie. Da sich die hier gefundenen Daten einschließlich der Zelltrennung nahezu vollständig mit den Befunden für die Affenleberzellen deckten, konnte hier auf eine ultrastrukturelle Untersuchung verzichtet werden (s. 4.3.). Unterstützt wurde diese Annahme durch die späteren biochemischen Ergebnisse, die eine hohe Vergleichbarkeit von Affen- und Humanleberzellen zeigten.

Vergleiche mit den Literaturdaten zur Morphologie von Leberzellen, speziell im Zusammenhang mit Leberfibrose, ergaben nur wenige Parallelen, da die meisten morphologischen Arbeiten über Leberzellen im Gewebe durchgeführt worden waren. Die morphologische Ausprägung einer Zelle in Monolayerkultur unterscheidet sich jedoch erheblich von ihrem Zustand im Gewebeverband. Gabbiani und Mitarbeiter (1o1,1o2,1o3) beschreiben eine kultivierten Fibroblasten ähnliche Zelle, deren Cytoplasma von verschiedenen Filamenten durchzogen ist und deren Zellkontakte an die glatter Muskelzellen erinnern. Sie finden diese Zelle in Granulomen bei der Wundheilung und neuerdings auch in zirrho-

tischer Leber (1o4). Sie nennen die Zelle Myofibroblast. Bhathal (1o5) berichtet über modifizierte Fibroblasten in zirrhotischer Leber, die starke ultrastrukturelle Parallelen zu den von Gabbiani et al. beschriebenen Myofibroblasten zeigen. Rudolph et al. (1o6) beschreiben sog. kontraktile Fibroblasten bei alkoholischer Leberzirrhose. Franke et al. (1o7) erwähnen die Existenz von Intermediärfilamenten in "Fibroblasten" aus Rattenleber.

Die ultrastrukturellen Befunde der in der obersten Bande des Dichtegradienten isolierten Affenleberzellen zeigen starke Äquivalenzen mit Daten aus den genannten Arbeiten, vor allem was die Ausbildung von Filamentsystemen und die Zellkontakte betrifft. Die Aufweitung des endoplasmatischen Retikulums sowie die starke Anhäufung von Sekretionsgranula in der Nähe der Zellmembranen läßt einen Vergleich der Zellen mit Fibroblasten zu.

Darüberhinaus beschreiben Gabbiani und Mitarbeiter (1o4) die Existenz von Basalmembranen bzw. von basalmembranenähnlichen Strukturen außerhalb ihrer Myofibroblasten. Bhathal (1o5) spricht von einzelnen basalmembranenähnlichen Strukturen. Elektronenmikroskopisch konnten in der vorliegenden Arbeit kaum Äquivalenzen dazu gefunden werden. Biochemisch jedoch konnten etliche mit der Existenz von Basalmembranen korrespondierende Daten für die oben im Gradienten bandierende Zellfraktion gefunden werden (s. 3.3.4.), so daß für diese Zellen der Begriff Myofibroblast als Arbeitsname mit guter Berechtigung aus der Literatur übernommen wurde. Es soll jedoch noch einmal deutlich darauf hingewiesen werden, daß es sich bei den Namen für beide

gereinigten Zellfraktionen um reine Arbeitsnamen handelt, die durch Beobachtungen in Zellkulturen zustandekamen und dadurch nur einen sehr bedingten morphologischen Vergleich mit den im Zellverband beschriebenen Zellen ermöglichen.

5.2. Wachstumsverhalten der Zellen in Primärkultur

Im Gegensatz zu den morphologischen Daten, die nur Hinweise auf Unterschiede zwischen gereinigten Myofibroblasten und endothelialen Zellen bezüglich ihrer Stoffwechselaktivität erbracht hatten, konnten in den folgenden Experimenten zum Kulturverhalten der beiden Zellfraktionen deutliche Differenzierungen aufgezeigt werden. (s. 3.3. und 4.4.). Bereits die Zellen der neugeborenen Affen zeigten sowohl bezüglich ihrer Adherens an das Kulturgefäß wie auch in ihrer Proliferationsgeschwindigkeit leichte Unterschiede, wobei die Myofibroblasten ein um einen Faktor 2 besseres Wachstumsverhalten hervorbrachten als die endothelialen Zellen. Darüberhinaus hatten diese Arbeiten mit den Affenleberzellen jedoch vorwiegend das Ziel der Etablierung der Methodik in möglichst kleinem Maßstab. Erste Hinweise zur Bedeutung der Zellen im Rahmen der Leberfibrose fanden sich in den Experimenten mit Humanleberzellen unterschiedlicher Herkunft.

Zunächst soll das Anwachsverhalten der Zellen betrachtet werden (vergl. Tab. 4). Myofibroblasten aus fibrotischer Leber zeigten eine um einen Faktor 5 bis 1o höhere Adherens an das Kulturgefäß innerhalb eines bestimmten Zeitraumes als Normallebermyofibroblasten, während endotheliale Zellen aus gesunder und pathologisch veränderter Leber gleichermaßen eine den Normallebermyofibroblasten äquivalente Adherens zeigten (s. 4.4.1.).

Jedoch gestaltete sich die Beurteilung der endothelialen Zellen aus fibrotischer Leber schwierig, da diese scheinbar durch eine die Fraktion verunreinigende Zellart überwachsen wurde, die phasenkontrastmikroskopisch den Myofibroblasten ähnlich war.

Für diese scheinbare Verunreinigung ist jedoch auch eine andere Interpretation denkbar. Wie aus der Diskussion der elektronenmikroskopischen Daten hervorgeht (s. 5.1.), handelt es sich bei den sog. Myofibroblasten und endothelialen Zellen um die prinzipiell gleiche Zellart unterschiedlicher Differenzierung, d.h. unterschiedlicher Stoffwechselaktivität. Dies gibt zu der Hypothese Anlaß, daß die diskutierten Zellen bei einer Störung der zellulären Regulationsmechanismen von einem in den anderen Differenzierungsgrad überführt werden können. Im pathologischen Fall der Leberfibrose ist, wie die Proliferationsergebnisse sowie die Analyse der Biosyntheseprodukte gezeigt haben, die zelluläre Ausprägung des Myofibroblasten im pathologischen Geschehen von größerer Bedeutung als die der endothelialen Zelle. Es ist denkbar, daß die endotheliale Zelle durch die fibrotischen Prozesse in der Leber in ihrem Stoffwechselgleichgewicht so gestört ist, daß sie sich in Richtung der Myofibroblasten differenziert. Letztendlich wird sich jedoch die Hypothese, daß es sich bei den zwei isolierten Zellfraktionen um eine unterschiedlich differenzierte Zellart handelt, nur durch immunologische Untersuchungen unterstützen oder widerlegen lassen. An dieser Stelle soll als nächstes die Wachstumsgeschwindigkeit der Humanleberzellen in der Primärkultur betrachtet werden (s. 4.4.2.). Auch hier zeigte sich eine gegenüber allen anderen Zellfraktionen weit überlegene Proliferationsgeschwindigkeit der Myofibroblasten isoliert aus fibrotischer Leber. Es könnte an dieser

Stelle zwar eingewendet werden, daß Adherens und Proliferation von Zellen in Kultur von vielen äußeren Faktoren abhängig sind, die im Gewebeverband keine oder eine ganz andere Rolle spielen (1o8), jedoch wurden alle untersuchten Leberzellfraktionen unter den gleichen minimalen Bedingungen - d.h. ohne Adherens - oder Proliferationsstimulantien - kultiviert und lediglich in der Primärkultur verglichen, so daß aus den bis hierhin gewonnenen Daten folgender Schluß zulässig ist: Die in der Einleitung (Kap. 1.2.) entwickelte Arbeitshypothese zur Regulation der Entwicklung der Leberfibrose als ein Zusammenspiel von gesteigerter Proliferation einer zur Bindegewebsbiosynthese befähigten Zelle und erhöhter Bindegewebsbiosyntheserate der einzelnen Zelle wird insoweit bestätigt, als daß aus dem Gewebe der fibrosierenden Humanleber eine Zelle isoliert werden konnte, die gegenüber der gleichen Zelle aus Normalleber und gegenüber einer anderen Zelle aus normaler und fibrotischer Leber um mehr als einen Faktor 6 stärker proliferierte. Da dieses Ergebnis in Primärkulturen gefunden wurde, kann als gesichert angesehen werden, daß die Stimulans dieser einen Zelle zu verstärkter Proliferation bereits im Gewebeverband vorgelegen hat.

5.3. Bindegewebsbiosynthese in der Primärkultur

Wie bis hierhin ausgeführt, gelang es in der vorliegenden Arbeit, zwei Leberzellfraktionen nach morphologischen Kriterien zu reinigen und in Primärkultur zu bringen. Es war in der Zellkultur jedoch nicht möglich, eine Zuordnung dieser Zellen in den in vivo Zellverband der Leber zu geben. Bedeutungsvoll für die Ausprägung der Leberfibrose erscheinen die Myofibroblasten

auf Grund ihres Wachstumsverhaltens in der Kultur. Das Interesse galt nunmehr der Befähigung der Myofibroblasten zur Biosynthese von Bindegewebe, zunächst im Vergleich mit den endothelialen Zellen.

Von mehreren Autoren war zu Beginn der Arbeit bereits die Biosynthese von Bindegewebe bei der Leberfibrose beschrieben worden (6,7,14,17). Jedoch wurde in allen Arbeiten das Bindegewebe direkt in der Leberbiopsie oder -autopsie analysiert und nicht in der Zellkultur. Der Nachteil eines solchen Vorgehens ist, daß nicht die Neusynthese des Bindegewebes erfaßt werden kann, sondern stets das Produkt aus der möglicherweise lange zurückliegenden Biosynthese und dem Abbau. Bindegewebsbiosyntheseuntersuchungen sind in Zellkulturen verschiedenster Gewebe seit längerer Zeit etabliert (52,1o9,11o,111). Nach mehreren Modifikationen konnten einige dieser Methoden aus der Literatur auf das vorliegende Problem angewendet werden.

5.3.1. Lokalisierung der Biosyntheseprodukte in der Zellkultur

Burke et al. (52) beschrieben die radioaktive Markierung von glatten Muskelzellen aus Aorta in Kultur und die anschließende Analyse der Biosyntheseprodukte. Dabei fanden sie bei Zugabe der Radioaktivität kurz vor Konfluenz der Zellkultur nach 24 Stunden Einbau 9o % der Prokollagene im Medium. Dieses Ergebnis veranlaßte, vor allem aus praktischen Gesichtspunkten die Suche nach einem Zeitpunkt für den Beginn des Markierungsexperimentes, an dem 24 Std. später möglichst viele Proteine in einer leicht zugänglichen Fraktion zu finden waren. In Kap. 3.1.4. wird die unterschiedliche Verteilung der einzelnen Kollagenbiosynthese-

produkte, insbesondere der Intermediärprodukte, bei radioaktiver Markierung von verschieden konfluenten Zellkulturen dargestellt. Je später die Kultur mit der radioaktiven Aminosäure inkubiert wird, desto größer wird der Anteil an radioaktiv markiertem Kollagen in der Zellfraktion, desto kleiner der relative Anteil des Prokollagens am neusynthetisierten Gesamtkollagen (Abb. 16). Die Erklärung für dieses zunächst einmal unlogisch klingende Ergebnis kann mit der Kenntnis der Bedeutung des Kollagens in der Zellkultur gegeben werden. In der Zellkultur wird häufig das Kollagen zur Beschichtung der Kulturgefäße verwendet, um eine gute Anheftung der Kulturzellen zu gewährleisten (1oo). Die Kollagenbeschichtung dient dabei als eine Art künstliche Zellmatrix (vergl. auch Kap. 5.1.). Im vorliegenden Fall wurden die Zellen ohne die Vorgabe eines Matrixmaterials zum Anwachsen gebracht. Es ist jedoch durch Elektronenmikroskopie gezeigt worden (s. Abb. 11), daß die Zellen während ihres Wachstums und besonders nach Erreichen der Konfluenz eine eigene Matrix im Raum zwischen Zellen und Kulturgefäß und im Interzellularraum ausbilden, in der vorwiegend bindegewebige Substanzen, also auch bereits fibrilläre Kollagene, abgelagert werden. Beim Abgießen des Kulturmediums bleiben diese Proteine, obwohl sie extrazellulär sind, an den Zellen assoziiert und erscheinen nach der Aufarbeitung im sog. Zellextrakt.

Der geringer werdende relative Anteil an löslichen Prokollagenen im Medium läßt sich auf das in der Zellkultur in dem engbegrenzten Rahmen von 24 Std. vorhandene Ungleichgewicht von Biosynthese und Abbau zurückzuführen, daß der Abbau

gehemmt ist. Die löslichen Prokollagene lagern sich nach Abspaltung der terminalen Peptide sehr schnell zu Fibrillen zusammen, die später noch quervernetzt werden (s. Abb. 2). Erst danach kann der Abbau durch Kollagenasen und Proteasen beginnen. Hieraus geht eine relativ kurze Lebenszeit der Prokollagene hervor. Da die Quervernetzung in der vorliegenden Kultur gehemmt ist (Hemmung durch ß-Aminopropionitrilfumarat), entspricht die gemessene Verschiebung der Biosyntheseprodukte zugunsten der fibrillären Kollagene in der konfluenteren Kultur sowie das Fehlen von säurelöslichem, d.h. quervernetztem Kollagen den Erwartungen.

Die Markierung der Kultur direkt bei Konfluenz und nicht später wurde für alle folgenden Versuche gewählt. Der Hauptteil der kollagenassoziierten Radioaktivität konnte im Medium nachgewiesen werden, so daß zum einen die Untersuchung der Zellextrakte vielfach wegfallen konnte und zum anderen die quantitative Gewinnung der Kollagene,solange sie überwiegend in löslicher Form vorlagen, erheblich erleichtert wurde. Beim Abkratzen der Zellen (s. 2.1.7.) ginge zu einem späteren Zeitpunkt sicherlich ein sehr großer Anteil der als Matrix abgelagerten Kollagene verloren oder wäre nur noch durch einen Pepsinabbau zu erfassen.

5.3.2. Trennung der Kollagene durch DEAE-Chromatographie

Da sich in der Elektrophorese der Kulturmedien und Zellextrakte direkt, ohne weitere Aufarbeitung, die einzelnen Banden der unterschiedlichen Kollagenketten teilweise überlagerten (s. Abb. 16), wurde im nächsten Schritt entsprechend der von Burke et al. (52) beschriebenen Methodik eine DEAE-Chromatographie

zur Auftrennung der Kollagenketten durchgeführt, um einen Überblick über die verschiedenen synthetisierten Kollagentypen zu erhalten. Es wurde lediglich das Kulturmedium untersucht, da im Zellextrakt ausschließlich α_1 und α_2-Ketten identifiziert worden waren, und eventuell vorhandene geringe Mengen anderer Kollagene höchstens in der Chromatographie ausverdünnt werden könnten.

In den Kulturen der Myofibroblasten konnte - zunächst rein qualitativ - die Biosynthese von Typ I, III, IV und V Kollagen sowie Fibronektin gezeigt werden (Abb. 18). Wie aus den in den Abbildungen dargestellten Fluorogrammen ersichtlich, war jedoch eine genaue Zuordnung der Radioaktivität enthaltenden Banden in der Elektrophorese schwierig. Lediglich Typ IV-Kollagen erschien in nahezu reiner Form im Durchlauf der DEAE-Säule. Typ V Kollagen war in der unreduzierten Elektrophorese deutlich erkennbar als zwei Banden im Molekulargewichtsbereich von 95.000 und 120.000 etwa im Mengenverhältnis 1 : 2 auftretend. Im reduzierten Zustand wurden diese Typ V Banden jedoch stark von Intermediärprodukten der Typ I und Typ III Kollagenbiosynthese überlagert.

Das Auftreten derart großer Mengen von Typ I und III Prokollagenen und vor allem von Prokollagenen, deren terminale Propeptide bereits teilweise abgespalten worden waren (Abb. 22), korreliert gut mit den von anderen Autoren in Zellkulturmedien, z.B. von glatten Muskelzellen oder von Fibroblasten gefundenen Kollagenbiosyntheseprodukten (86,110). Die Mengenverhältnisse solcher Zwischenprodukte der Kollagenbiosynthese haben höchstwahrscheinlich nur wenig Bedeutung bei der Regulation der Leberfibrose,

da die festen fibrillären Kollagenstrukturen bestimmend sind für das pathologische Bild dieser Erkrankung. Außerdem wird die Mengenverteilung der Intermediärprodukte mit Sicherheit stark durch die Zellkulturbedingungen geprägt, so daß es sinnvoller war, die DEAE-Chromatographie zu verlassen, und zu einer einzelnen Betrachtung der verschiedenen Kollagentypen nach einer Reinigung und vor allem nach einer Überführung der Intermediärprodukte in die Endform der α-Kette (s. Abb. 2) durch proteolytischen Abbau überzugehen.

Es wurde jedoch bereits nach der DEAE-Chromatographie sehr deutlich: die größere Rolle bei der Biosynthese von Bindegewebsproteinen scheinen ebenfalls die Myofibroblasten zu spielen. Ein Vergleich der DEAE-Chromatogramme von Myofibroblastenkulturmedium und Medium der endothelialen Zellen konnte zwar nur für die Affenleberzellen durchgeführt werden (s. 4.3.), jedoch wurde hier sehr deutlich, daß die Myofibroblasten sowohl mehr Gesamtkollagen synthetisieren können, als auch allein in der Lage sind, Basalmembranenproteine zu produzieren. Typ IV Kollagen konnte in den endothelialen Zellen gar nicht, Typ V Kollagen und Fibronektin nur in sehr geringen Mengen synthetisiert werden (Abb. 18, Tab. 2).

Erwähnenswert bleibt noch der Vergleich des Biosynthesemusters der Myofibroblasten aus Affenleberzellen und aus normalen und fibrotischen Humanleberzellen (Tab. 2 und Tab. 5). Während das Biosynthesemuster von Affenleberzellen und fibrotischen Humanleberzellen identisch ist, fehlt bei den Normalleberzellen das Basalmembranenkollagen Typ IV und das Fibronektin. Wie später gezeigt werden konnte, liegt das jedoch an der unzureichenden Empfindlichkeit der Methode der DEAE-Chromatographie. Festzu-

halten ist jedoch, daß Typ IV Kollagen und Fibronektin in der normalen Leber nur in äußerst geringen Mengen synthetisiert wird. Dieses Ergebnis korreliert gut mit den in der Einleitung erwähnten und auch neueren immunfluoreszenzoptischen Daten (8,112). Auch dort wurden in der normalen Leber nur an ganz wenigen Stellen in der Nähe der großen Gefäße Spuren dieser beiden Bindegewebsproteine gefunden.

Bei der qualitativen Betrachtung der Biosyntheseprodukte soll noch einmal auf die in Kap. 5.3. diskutierten endothelialen Zellen aus fibrotischer Leber, die in der Kultur durch Myofibroblastenähnliche Zellen verdrängt werden, zurückgegangen werden. Aus dem in Abb. 3o veranschaulichten Kollagenbiosynthesemuster dieser Zellfraktion im Vergleich mit dem der "echten" Myofibroblasten geht die Bestätigung der Vermutung hervor, daß es sich in den konfluenten Zellkulturen beider Fraktionen um den gleichen Zelldifferenzierungstyp handelt.
Erstaunlich erscheint letztlich noch die offensichtlich sehr hohe Kollagenbiosyntheserate in Affenleberzellen, denn diese Zellen sollten ja eher den Normalleberzellen vergleichbar sein. Hier muß jedoch berücksichtigt werden, daß es sich um Zellen von neugeborenen Affen handelt. Für Neugeborene und Kleinkinder ist bekannt, daß bei ihnen eine normale Kollagenbiosyntheserate - nachweisbar an Hand von Prokollagenpeptiden als Stoffwechselendprodukt im Serum - in einer Höhe von für Erwachsene strikt pathologischen Werten vorliegt (113 ,Vargas et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Auch für fetale Hautfibroblasten in Zellkultur wurde beispielsweise eine Kollagenbiosynthese gemessen, wie sie bei Erwachsenen nur in pathologisch veränderten Hautfibro-

blasten vorkommt (114). Aus diesen Gründen können die Affenleberzellen in diesem Rahmen zwar als gut geeignet zur Etablierung von Mikromethoden angesehen werden, jedoch dürfen die Ergebnisse bezüglich ihrer Biosyntheserate nicht mit den normalen Humanleberzellen gleichgesetzt werden. Interessant erscheint der Vergleich der Biosyntheserate und des Biosynthesemusters zwischen den Zellen der neugeborenen Affen und den fibrotischen Humanleberzellen, die nahezu identisch sind. Diese Daten können als eine Bestätigung der Theorie, daß eine einmal genetisch verankerte Potenz zur Biosynthese eines bestimmten Proteins zwar beim gesunden Erwachsenen reprimiert sein, im pathologischen Zustand jedoch leicht wieder abgerufen wird, gewertet werden (115).

5.3.3. Biosyntheseraten von Typ I und Typ III Kollagen

Wie bereits ausgeführt, wurde für einen genauen Vergleich der Verhältnisse der einzelnen Kollagentypen untereinander die Reinigung der verschiedenen Proteine nach proteolytischem Abbau notwendig. Insbesondere Typ I und Typ III Kollagen lagen in der Zellkultur in den verschiedensten Biosynthesestufen (s. Abb. 2) vor. Die Intermediärprodukte wurden deshalb durch Pepsinabbau in α_1 und α_2-Ketten überführt und gereinigt (s. 3.5.2.). Die Reinigung nach den schon seit längerer Zeit in der Literatur beschriebenen Methoden war nicht ohne weiteres auf die hier gegebenen Verhältnisse übertragbar. Für die Isolierung von Typ I Kollagen aus verschiedenen Geweben und Zellkulturen (Lunge (116), Leber (17), Fibroblasten in Kultur (114), glatte Muskelzellen in Kultur (51)) nach Dialyse des extrahierten

Kollagens gegen Tris-Puffer, pH 7,4, also ausgehend von einem neutralen pH, wird eine Salzfällung um 2,7 M NaCl beschrieben; Typ III wird unter den gleichen Bedingungen mit 1,6 - 1,8 M NaCl gefällt (17,51,116).

Direkt nach einer Essigsäureextraktion, also aus einem sauren Milliö (um pH 2,5), wird eine mehr oder weniger quantitative - oft muß die Fällung mehrmals wiederholt werden - Präcipitation von Typ I und Typ III Kollagen gemeinsam mit o,7 - o,9 M NaCl beschrieben (117,63,87).

Da Typ I und Typ III Kollagen möglichst getrennt isoliert werden sollten, wurde zunächst eine Fällung aus einem neutralen pH versucht. Mit 1,8 M NaCl wurde jedoch bereits eine große Menge Typ I Kollagen mitgefällt. Bei Rückgang der Salzkonzentration auf o,9 M wurde zwar kein Typ I Kollagen mehr mitgefällt, jedoch auch Typ III Kollagen wurde nicht mehr quantitativ präcipitiert. Bei einer Präcipitation aus dem sauren Bereich wurde jedoch entgegen den Literaturdaten ca. 9o % des Typ III Kollagens allein gefällt. Der Rest des Typ III wurde zusammen mit Typ I mit 2,7 M NaCl präcipitiert. Wahrscheinlich wäre unter sauren Bedingungen auch eine quantitative Fällung von Typ I mit weniger NaCl möglich gewesen; dieses wurde jedoch nicht versucht, da es im vorliegenden Experiment nicht um eine Optimierung der Salzpräcipitation verschiedener Kollagene aus Myofibroblastenkulturen ging, sondern lediglich um eine weitgehende Trennung von Typ I und III Kollagen zum Zweck der leichteren Quantifizierung.

Die nur schlecht durchführbare Trennung der beiden Kollagene aus dem neutralen pH findet in der Literatur einige Parallelen.

In den meisten Geweben konnte keine ganz komplette Trennung von Typ I und III durch fraktionierte Salzfällung beschrieben werden (17,51,116), so daß auch andere Methoden, z.B. Trennung durch Denaturierung und Renaturierung der extrahierten Kollagenmischung, herangezogen wurden (118).

Im Falle der in der Literatur beschriebenen Präcipitation mit o,7 oder o,9 M NaCl aus einem sauren pH, war stets die Reinigung anderer Kollagene als Typ I oder Typ III das Ziel. Diese Fällung diente nur zur Entfernung dieser Kollagene, so daß eine Differenzierung von Typ I und III nie in Betracht kam. Hieraus geht hervor, daß diese Literaturdaten nicht ohne weiteres zum Vergleich mit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methode zur getrennten Fällung von Typ I und III Kollagen herangezogen werden können. Im Hinblick auf die gegebene Fragestellung war es auch gar nicht sinnvoll, dem Fällungsproblem weiter nachzugehen, zumal eine gute Reproduzierbarkeit der Methode gezeigt werden konnte und eine leichte Quantifizierung der Kollagentypen möglich war, da Typ III als völlig reine Fraktion gewonnen werden konnte.

Die Methode der Quantifizierung wird unter 3.5.2. ausführlich beschrieben und auch mit anderen Methoden aus der Literatur verglichen. Die sehr aufwendige Methode der Elektrophorese mit anschließender Fluorographie und Densitometrie hat sich im Rahmen der vorliegenden Problemstellung bewährt, da Elektrophorese und Fluorographie ohnehin durchgeführt werden mußten, um die gereinigten Kollagenfraktionen zunächst qualitativ zu analysieren. Der Nachteil der Methode ist jedoch, daß nur eine relative Aussage in % vom Gesamtkollagen und keine direkte in mg/ml

gemacht werden kann; außerdem ist sie für vergleichende Untersuchungen bei einer größeren Anzahl von Patienten mit und ohne Leberfibrose und mit Leberfibrosen unterschiedlicher Ätiologie, die zur Unterstützung und vor allem zur Differenzierung der hier beschriebenen Daten angestrebt werden sollten, extrem zeitaufwendig und auf Grund ihrer Kompliziertheit sehr anfällig für Fehler. Daher sollte zur Quantifizierung gereinigter Kollagenfraktionen die Anwendung der alten Methode von Juva und Prockop (119) zur Bestimmung von radioaktivem Hydroxyprolin in Erwägung gezogen werden, zumal die für die Messung interessanten Kollagene ohnehin durch die Markierung in der Zellkultur mit radioaktivem Prolin einen recht hohen Anteil an ^{3}H -Hydroxyprolin enthalten sollten. Es bedarf vorher jedoch der Klärung, ob die sehr geringen zu messenden Mengen an Hydroxyprolin mit dieser Methode ohne zu große Streuungsfehler erfaßt werden können.

Die Ergebnisse der Quantifizierung von Typ I und Typ III Kollagenen aus Myofibroblasten und bei den Affenleberzellen auch aus endothelialen Zellen sind in Tab. 3 und Tab. 6 zusammengefaßt. Wie in 3.5.2. bereits ausgeführt, waren hier weniger die absoluten Mengen dieser beiden Kollagentypen von Interesse, zumal für Typ I und III die geringste Steigerung von der normalen zur fibrotischen Leber im Vergleich zu den anderen Kollagenen gemessen wurde (s. 4.5.3.); interessant war eine Verschiebung des Verhältnisses von Typ I zu Typ III bei der Leberfibrose, wie es in der Literatur an einigen Stellen diskutiert wird, besonders deshalb, weil die Literaturdaten sich sehr widersprüchlich darstellten.

Diese Verwirrung der Literaturdaten beginnt bereits bei den Werten für die gesunde Leber eines Erwachsenen und wird für fibrotisches bzw. zirrhotisches Gewebe nur noch gravierender. Seyer et al. (12o) ermittelten für Normalleber 53 % Typ I Kollagen und 47 % Typ III, während Rojkind und Martinez-Palomo (46) 8o % Typ I und 2o % Typ III fanden, Rojkind et al. (17) dagegen etwa gleiche relative Mengen von Typ I und Typ III angeben. Gay et al. (13) haben im fibrotischen Gewebe eine Steigerung der Biosynthese von Typ III Kollagen gefunden, sowie das Neuauftreten eines zirrhosetischen Typ I ähnlichen Kollagens; möglicherweise handelt es sich hierbei um Typ I-Trimer, einem Typ I Kollagen, das nur aus α_1-Ketten besteht: $[\alpha_1\ (I)]_3$. Diese letzteren Daten ließen sich jedoch nicht bestätigen. Rojkind und Martinez-Palomo (46) fanden ebenfalls einen erhöhten Typ III Kollagenspiegel, der jedoch letztlich nur zu einem relativen Gleichgewicht zwischen Typ I und III führte. Howard et al. (121) berichten über eine gesteigerte Typ III Proliferation bei Fibrose durch chronisch aktive Hepatitis. Seyer et al. (12o) dagegen haben einen Anstieg der Typ I Biosynthese auf 66 - 82 % im fibrotischen Gewebe gemessen. Rojkind et al. (17) fanden von Patient zu Patient sehr unterschiedliche Verhältnisse von Typ I zu Typ III. Eine zusammenfassende Übersicht über die bis heute veröffentlichten Daten der verschiedenen Autoren gibt Tab. 7.

Bei diesen z.T. widersprüchlichen Angaben sind insbesondere die älteren Daten mit großer Vorsicht zu betrachten, da erst 1976 und 1978 begonnen wurde, die Kollagentypen IV und V genauer zu charakterisieren (122,63). Mit großer Wahrscheinlichkeit waren die früher als Typ I und III gemessenen Fraktionen noch relativ stark verunreinigt.

Tab.7

Biosyntheseraten von Typ I und III Kollagen in normaler und fibrotischer Humanleber

Zustand des Lebergewebes	Typ I %	Typ III %	Autor
normal	80	20	Rojkind & Martinez-Palomo, 1976 (46)
normal	52	48	Seyer et al., 1977 (120)
normal	ca.50	ca.50	Rojkind et al., 1979 (17)
fibrotisch	ca.60	ca.40	Gay et al., 1975 (13)
fibrotisch	Steigerung der Typ III Biosynthese (keine Mengenang.)		Howard et al., 1975 (121)
fibrotisch	55	45	Rojkind & Martinez-Palomo, 1976 (46)
fibrotisch	66-82	18-34	Seyer et al., 1977 (120)
fibrotisch	35 38 41	43 39 33	Rojkind et al., 1979 (17)

Fragwürdig erscheint außerdem in einigen Fällen die Meßmethode durch Bestimmung des Hydroxyprolingehaltes der einzelnen Proben. Insbesondere bei sehr kleinen Ausgangsgewebemengen in Feinnadelbiopsien ist ein hoher Streuungsfehler bei den Bestimmungen anzunehmen.

Zuletzt muß noch der Leberstatus betrachtet werden, an dem eine Biopsie entnommen wurde. Wie bereits in der Einleitung und zu Beginn der Diskussion erwähnt, muß dabei, wie bei jedem Stoffwechselvorgang, die Biosynthese korrespondierend mit dem Abbau berücksichtigt werden. Dieses Gleichgewicht kann bei pathologischer Stoffwechsellage in beide Richtungen verschoben sein. Bei der Betrachtung von Biosyntheseprodukten in einem erkrankten Organ darf also ein eventuell gestörter Abbau nicht außer Acht gelassen werden. Der Abbau des Kollagens ist jedoch bislang vergleichsweise wenig untersucht (123) und über die Kollagendegradation in der fibrotischen Leber gibt es bislang nur Spekulationen. In fast allen zitierten Arbeiten zum Verhältnis von Typ I zu III Kollagen in Leber bleiben Abbauaktivitäten völlig unbeachtet. Bereits bei der routinemäßigen pathologischen Untersuchung zur diagnostischen Begutachtung der Leberbiopsien werden jedoch Unterschiede zwischen mehr oder weniger aktiven Fibrosen gemacht, so daß bei heterogenem Material stark unterschiedliche Messungen zum Kollagengehalt durchaus verständlich, oder sogar zu erwarten sind. Eine derartige Problematik wird auch von Rojkind et al. (17) diskutiert. Sie finden ein stark unterschiedliches Verhältnis von Typ I zu Typ III Kollagen, jeweils abhängig von der Gesamtmenge des in der Leber abgelagerten Kollagens.

An dieser Stelle wird der große Vorteil der in der vorliegenden Arbeit angewendeten Methode der Zellkultur deutlich. Hier kann ein genau definierter Abschnitt der Biosynthese mit genau definiertem Material herausgegriffen werden, ohne daß - durch den zugegebenen Hemmstoff - die Degradation eine Rolle spielt. Zwar bringt die Zellkultur auch den Nachteil mit sich, daß eine Zelle in Kultur über längere Zeit hin, also besonders bei wiederholten Passagen, ihre Stoffwechselleistungen stark verändern kann. Um diesem Nachteil auszuweichen, wurden im vorliegenden Fall lediglich Primärkulturen verwendet, die ihre Stoffwechselleistungen nur wenig verändern.

Wie aus Tab. 6 hervorgeht, wurde in den Myofibroblastenkulturen aus Humanleber eine Umkehrung des Biosyntheseverhältnisses von Typ I zu Typ III Kollagen von der normalen zur fibrotischen Leber zugunsten einer erheblich höheren Biosyntheserate von Typ III in der fibrotischen Leber gemessen. Vergleicht man diese Daten mit den Myofibroblasten der neugeborenen Affen (s. Tab. 3), ist die relativ hohe Biosynthese von Typ III Kollagen bei diesen auffällig. Korrespondierend mit den Werten der normalen Humanleber sollte hier eigentlich eine höhere Biosynthese von Typ I Kollagen gemessen werden. Dies wird verständlicher, wenn man die Ergebnisse von Howard et al. (121) betrachtet, die eine mit steigendem Alter des Individuums abnehmende Biosynthese von Typ III Kollagen in der Leber zeigen. Hier läßt sich wiederum eine Korrelation mit der im vorigen Kapitel diskutierten Hypothese der Rückkehr im pathologischen Geschehen zu embryonalen Stoffwechselpotenzen finden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß korrespondierend mit der überwiegenden Anzahl der Literaturdaten (13,17,46,121), gefunden im Lebergesamtgewebe, in den fibrotischen Humanlebermyofibroblasten in Primärkultur eine gegenüber den Normallebermyofibroblasten deutlich gesteigerte Biosynthese von Typ III Kollagen vorhanden ist, während Typ I Kollagen viel weniger stark erhöht gefunden wird.

5.3.4. Bedeutung der Basalmembranenproteine Typ IV und V Kollagen, Fibronektin und Laminin bei der Leberfibrose

Die Kollagentypen IV und V sowie das Basalmembranenglycoprotein Laminin sind erst in den letzten Jahren genau beschrieben worden, so daß nur sehr wenige Daten über diese Proteine im Lebergewebe in der Literatur zu finden sind. Wie der in der Einleitung beschriebene Nachweis von Kollagenen und Glykoproteinen im Lebergewebe durch Immunfluoreszenz (8) zeigt, sind jedoch gerade diese Basalmembranenproteine bei der Leberfibrose von besonderem Interesse, da schon seit langem (12) eine Bildung von basalmembranenähnlichen Strukturen um die Sinusoide herum als Teil des fibrotischen Prozesses diskutiert wird, was zu einem verminderten Stoffaustausch zwischen Leberblut und Hepatozyten und somit letztendlich zu Zellnekrosen führen könnte. Die wichtigsten Informationen liefern hier wohl zunächst Typ IV Kollagen und Laminin, die als reine Basalmembranenproteine angesehen werden, da sie bislang kaum außerhalb dieser Strukturen gefunden wurden 124).

Das Typ IV Kollagen wurde in den Myofibroblasten der Affenleber-Zellen und der fibrotischen Humanleberzellen gefunden. In der DEAE-Chromatographie des Mediums der Normalleberkultur war kein

Typ IV Kollagen nachweisbar; durch Immunpräcipitation konnte dann scheinbar doch eine ganz geringe Menge von Typ IV in dieser Fraktion nachgewiesen werden (s. 4.5.6.).

Zunächst soll die Isolierung und Identifizierung des Typ IV Kollagens betrachtet werden. Bereits 1969 (125) wurde ein Basalmembranenkollagen, bestehend aus drei identischen α_1-Ketten und einem Kohlenhydratanteil in Nierenglomeruli beschrieben. Jahre später (126,127) konnte aus dem gleichen Organ eine Kollagenfraktion nach Pepsinabbau isoliert werden, die zwar eine sehr ähnliche Aminosäuren- und Kohlehydratzusammensetzung zeigte, jedoch in der SDS-Elektrophorese eindeutig aus unterschiedlichen Kollagenkomponenten mit Molekulargewichten zwischen 14o.ooo und 65.ooo bestand. Ohne gezielten Proteaseabbau wurde in solchen Kollagenfraktionen durch Salzfällungen eine noch größere Heterogenität an Komponenten gefunden (122). Diese Vielfalt an unterschiedlichen Ergebnissen ist höchstwahrscheinlich auf die Existenz von mehreren, auch zentral lokalisierten proteasesensitiven Regionen im nativen Typ IV Kollagen zurückzuführen, die in anderen Kollagentypen nicht vorkommen. Neuere Daten (128,129) dokumentieren die Isolierung von zwei genetisch unterschiedlichen Typ IV Kollagenkomponenten aus pepsinabgebautem Basalmembranenmaterial aus Plazenta durch fraktionierte Salzfällung.

Die Anwendung dieser Methoden zur Reinigung von Typ IV Kollagen nach dem Prinzip der im vorigen Absatz diskutierten Isolierung von Typ I und III Kollagen mußte jedoch auf Grund der sehr geringen Mengen an zu untersuchendem Material ausscheiden, da diese Methode sehr viele Fällungsschritte mit Proteinverlusten beinhaltete. Außerdem erschien es zweifelhaft, ob die in Plazenta

gewonnenen Daten problemlos auf Leberzellkulturen übertragen werden konnten.

Aus diesen Gründen wurde die Bestimmung von Typ IV Prokollagen vorgezogen, da auf diese Weise quantitativ genauer gearbeitet werden konnte, weil die Unwegbarkeiten eines an mehreren Stellen im Molekül angreifenden Pepsinabbaus ausgeschlossen bleiben. In mehreren Arbeiten (64,94,13o) war die Charakterisierung von Typ IV Prokollagen aus Medien unterschiedlicher Zellkulturen in der Elektrophorese als Doppelbande mit einem Molekulargewicht um 18o.ooo übereinstimmend beschrieben worden. Die von diesen Autoren vorgestellten Methoden konnten im vorliegenden System gut reproduziert werden (DEAE-Chromatographie s. 3.4.2. und 4.5.2.), wenn eine bestimmte Syntheserate von Prokollagen Typ IV nicht unterschritten wurde. Da in normalen Humanleberzellen mit dieser Methode kein Typ IV gefunden wurde, wurde zusätzlich die Methode der Immunpräcipitation herangezogen (s. 4.5.6.), da Chrouch et al. (131) hierdurch gute Resultate direkt im Kulturmedium erzielen konnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Präcipitation mit unspezifisch angereicherten Antikörpern gegen Typ IV aus einem Maustumor (64) versucht. Es war jedoch keine Präcipitation der in der Literatur beschriebenen Doppelbande (131) möglich. Es wurden lediglich Einzelbanden allerdings im gleichen Molekulargewichtsbereich gefunden. Da es sich beim Prokollagen Typ IV um zwei genetisch verschiedene Proteine handelt (132), die zu der Doppelbande im SDS-Gel führen, ist es durchaus vorstellbar, daß nur gegen eines dieser Proteine ein ausreichender Antikörpertiter gebildet wurde. Eine andere Möglichkeit zur Erklärung ergibt die

unspezifische Anreicherung des Antikörpers (s. 2.1.13.): Durch die Chromatographie an Typ I bzw. Typ III substituierter Sepharose könnte durch Kreuzreaktionen ein Teil der Antikörper verlorengegangen sein. Diese Anreicherungsschritte waren dennoch zwingend notwendig, da bedingt durch den verunreinigenden Titer an anti-Typ I bzw. anti-Typ III die Immunreaktion von anti-Typ IV mit Typ IV gestört wurde.

Dieser Punkt kann nicht endgültig geklärt werden, jedoch ist das präcipitierte Protein mit Sicherheit mit einer der Prokollagen Typ IV Banden identisch, da auch aus dem Durchlauf der DEAE-Chromatographie, in dem das Prokollagen Typ IV in nahezu reiner Form vorliegt, eine der Banden präcipitiert werden konnte (s. Abb. 35).

Bei Betrachtung aller Daten zum Typ IV Kollagen, kann es nach allem bis hierhin ausgeführten als gesichert angesehen werden, daß es sich bei der im Durchlauf der DEAE-Chromatographie vorhandenen Doppelbande im Molekulargewichtsbereich von 180.000 sowie bei den durch Immunpräcipitation gefundenen Einzelbanden mit diesem Molekulargewicht um Prokollagen Typ IV handelt.

Die gezielte Untersuchung von Laminin wurde in der vorliegenden Arbeit lediglich in Affenleberzellkulturen durchgeführt. Es konnte keinerlei Laminin nachgewiesen werden (s. 3.4.3.). Laminin ist erst vor wenigen Jahren als Bestandteil von Basalmembranen isoliert und charakterisiert worden (72). Da es in bislang untersuchten Basalmembranen immer zusammen mit Typ IV Kollagen gefunden wurde (133), könnte das Proteinpaar Typ IV Kollagen/Laminin als Marker für die Existenz einer typischen Basalmembran angesehen werden. Hinzu kommt die immunfluoreszentoptische Darstellung von Laminin in fibrotischer Leber

entlang der Sinusoide (8), so daß zunächst die Biosynthese von Laminin in den Zellkulturen erwartet wurde.

In den letzten Monaten wurden Arbeiten bekannt, in denen berichtet wurde, daß das Verhalten von Laminin in der Ionenaustauschchromatographie sehr variabel sein kann, d.h. es kann unter Umständen auch an den Ionenaustauscher binden und mit Salz eluiert werden (134). In diesem Fall jedoch müßte dieses Protein in den Elektrophoresen der Eluate der DEAE-Chromatographie in den reduzierten Proben nachzuweisen sein. In keiner der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen war ein solches Protein gefunden worden. Hinzu kommt, daß die Genauigkeit der Färbung von Laminin durch Immunfluoreszenz bereits in der zitierten Arbeit (8) in Frage gestellt wird. Da Laminin im nativen Zustand ein sehr großes (MG mehr als 800.000) und hydrophobes Protein ist, das zu Aggregationen neigt, ist die genaue Charakterisierung eines Antikörpers erschwert, so daß unspezifische Kreuzreaktionen nicht ausgeschlossen werden können. Darüberhinaus wurde kein anti-Humanlaminin verwendet, was eine weitere Möglichkeit für unspezifische Kreuzreaktionen offenläßt. Neuere immunflureszenzoptische Ergebnisse in Affenlebern mit experimenteller Fibrose und Zirrhose (Lieber und Hahn, unveröffentlichte Ergebnisse) konnten die für zirrhotische Humanleber gefundenen Daten (8) bezüglich des Laminins nicht bestätigen.

Nach diesen bisher vorliegenden Daten kann zusammengefaßt werden, daß weder in normaler noch in fibrotischer Leber in der Zellkultur eine dem Basalmembranenlaminin äquivalente Menge dieses Glykoproteins nachgewiesen werden konnte.

Ein weiterer Bestandteil von Basalmembranen ist das Fibronektin, das darüberhinaus jedoch auch anderweitig weit verbreitet ist (z.B. Plasma-Fibronektin). So konnte Fibronektin bislang als einziges Bindegewebsprotein in Hepatozyten nachgewiesen werden. Die Identifizierung von Fibronektin als Biosyntheseprodukt der gereinigten Leberzellen in Kultur ist in den Kapiteln 3.5.4. und 4.5.5. beschrieben und erscheint relativ problemlos. Entsprechend den Literaturdaten (52,72) konnte Fibronektin an DEAE-Cellulose gebunden werden und wurde mit 25o mM NaCl eluiert. Da jedoch nur sehr geringe Mengen an Fibronektin gefunden wurden, wurde die Quantifizierung durch Immunpräcipitation versucht (73). Dabei wurden aus dem Kulturmedium von fibrotischer Humanleber anstatt, wie erwartet, einer Bande 4 verschiedene Banden im Molekulargewichtsbereich zwischen 22o.ooo und 1oo.ooo Dalton präcipitiert. Eine der Banden entsprach dem Plasmafibronektinmarker.

Vartio et al. (93) berichteten 1981 über proteasespaltbare Untereinheiten von Matrixfibronektin, die auch als Degradationsprodukte in vivo vorliegen können, und z.T. in dem hier vorgefundenen Molekulargewichtsbereich lokalisiert wurden. Da die Fibronektinbiosynthese der Zellen im einzelnen auf Grund der universellen Verbreitung dieses Proteins nicht von so großem Interesse war, wurde dem Problem der Spaltprodukte nicht weiter nachgegangen. Es kann jedoch festgehalten werden, daß ausschließlich die Myofibroblasten aus fibrotischer Leber in den Primärkulturen das in Basalmembranen enthaltene Fibronektin synthetisieren.

Neben den genannten Proteinen ist auch Typ V Kollagen in Basalmembranen beschrieben worden. Daneben gilt es jedoch auch als sog. Muskelkollagen (135), und es gibt Hinweise für eine weitere

nahezu universelle Verbreitung von Typ V.

Die Biosynthese dieses Proteins konnte, wie auch für Typ I und III, in allen untersuchten Zellfraktionen gezeigt werden, wobei sich die Biosyntheseraten jedoch deutlich unterschieden (s. 3.4.3. und 4.5.4.). Auffällig war, daß die Gesamtmenge an Typ V Kollagen im Vergleich zu den anderen Kollagenen insbesondere bei den Myofibroblasten relativ hoch war.

Letzterer Befund unterstützt die Berechtigung bei den Myofibroblasten von fibroblastenartigen Zellen zu sprechen, die eine Differenzierung hin zu einem muskelzellähnlichen Typ zeigen (vergl. Kap. 5.1.).

Typ V Kollagen ist bislang das einzige in Basalmembranen vorkommende Kollagen, das im Lebergewebe biochemisch nachgewiesen worden ist. Rojkind et al. (17) haben es zusammen mit anderen Basalmembranenkollagenen, die sie jedoch nicht näher spezifizieren konnten, aus normaler und vor allem aus fibrotischer Humanleber isoliert. Sie beschreiben ein Ansteigen dieser Kollagene in fibrotischer und zirrhotischer Leber, geben jedoch keine absoluten Werte für das Maß der Erhöhung an.

Nachdem die Biosynthese verschiedener Basalmembranenproteine vor allem durch Humanlebermyofibroblasten in Kultur diskutiert wurde, sollen abschließend Rückschlüsse vom Biosynthesemuster auf eine mögliche Bedeutung dieser Proteine in der Leber, insbesondere im pathologischen Zustand einer Fibrose, gezogen werden. In Tab. 8 ist die Biosynthese von Basalmembranenproteinen in normaler und fibrotischer Humanleber noch einmal vergleichend zusammengefaßt.

Tab.8

Biosynthese von Basalmembranenproteinen in Myofibroblasten aus normaler und fibrotischer Humanleber

Protein	Normalleber	fibrotische Leber
Typ IV Kollagen	+	++++
Laminin	-	-
Fibronektin	-	++
Typ V Kollagen	+	+++++

Insgesamt ist eindeutig eine erheblich gesteigerte Biosynthese von Basalmembranenproteinen in fibrotischer Leber zu verzeichnen. Es wird jedoch deutlich, daß es sich in keinem Fall, also weder in der Normalleber noch in der fibrotischen Leber, um eine typische Basalmembranenproteinenzusammensetzung handelt, wie sie z.B. in Nierenglomeruli oder im Nervengewebe gefunden wird (133), da kein Laminin nachgewiesen werden konnte. Dieser Befund deckt sich mit einigen z.T. auch schon älteren Daten morphologischer und immunologischer Art aus der Literatur.

Wie schon in der Einleitung erwähnt, beschrieben Schaffner und Popper (12) bereits 1963 basalmembranenähnliche Strukturen entlang der Sinusoide in zirrhotischer Leber durch Elektronenmikroskopie. Diesen Strukturen fehlte die typische Schichtung der Basalmembranen. Schaffner selbst (136) und einige andere Autoren (137, 138) konnten diese Ergebnisse 197o und später bestätigen. Tanikawa (139) berichtet über amorphes Material, möglicherweise Basalmembranen ähnlich, entlang der Sinusendothe-

lien, aber auch um die Hepatozyten in der Nähe der Sinusoide.

In den vorliegenden ultrastrukturellen Untersuchungen konnten kaum solche basalmembranenartigen Strukturen in den Interzellularräumen gefunden werden. Es war jedoch auch zu erwarten, daß sich solche Strukturen vorwiegend zwischen Zellen und Kulturgefäß ausbilden würden.

Neueste immunologisch-elektronenoptische Arbeiten von Grimaud et al. (14o) beschreiben ebenfalls eine unstrukturierte bindegewebige Matrix im Perisinusoidalraum von fibrotischen Lebern. Alle diese morphologischen Daten werden durch die hier gefundenen biochemischen Ergebnisse bestätigt. Das durch die Myofibroblasten in Zellen aus fibrotischer Leber gegenüber Normalleberzellen um einen Faktor 4 bis 5 verstärkt hervorgebrachte Basalmembranenproteinmuster könnte - durch das Fehlen von Laminin - zu einer untypischen amorphen Basalmembranenstruktur führen.

5.4. Kollagenbiosynthetisierende Enzyme

Nach der Untersuchung der Kollagenbiosyntheseprodukte von normalen und fibrotischen Humanlebermyofibroblasten in der Zellkultur, war es sinnvoll, die Menge der gefundenen Produkte mit der Aktivität der für ihre Biosynthese verantwortlichen Enzyme zu vergleichen. In der Einleitung ist bereits auf das Problem der Aussagekraft von Enzymaktivitätsmessungen im Gewebeextrakt hingewiesen worden (s. 1.2.). Da eine in einer Zelle bzw. in einem Gewebe gefundene Proteinkonzentration stets in Abhängigkeit von einer biosynthestischen und einer abbauenden Aktivität gesehen werden muß, besteht nur ein sehr bedingter Zusammenhang zwischen der Aktivität der Biosyntheseenzyme und dem im Gewebe gefundenen Produkt.

Über die proteolytische Aktivität der Kollagenase bzw. der Kollagenasen, besteht bislang jedoch nur ein sehr unvollständiges Bild (123). Mittlerweile existieren zwar einige Arbeiten über Substratspezifitäten - d.h. die Spezifität für den bevorzugten Abbau eines bestimmten Kollagentyps - verschiedener Kollagenasen. Erkenntnisse über den enzymatischen Reaktionsmechanismus oder gar über die Regulation der Enzymaktivität stecken jedoch noch in den Anfängen. Aus diesen Gründen war es bislang auch noch gar nicht möglich, sinnvolle vergleichende Untersuchungen über kollagensynthestisierende Enzyme, Kollagenspiegel und kollagenabbauende Enzyme im Zusammenhang durchzuführen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei kollagensynthetisierende Enzyme im Zellkultursystem untersucht, in der Hoffnung, durch den Vergleich von Enzymaktivitäten und radioaktiv markierten Biosyntheseprodukten einen Hinweis auf die Rolle des Kollagenabbaus für die Ausprägung der Stoffwechselstörung Leberfibrose zu erhalten. Im Rahmen der gegebenen Thematik war es unmöglich, alle an der Kollagenbiosynthese beteiligten Enzyme (s. Abb. 2) zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde zunächst das am besten charakterisierte Enzym, die Prolinhydroxylase (32), für die Messung ausgewählt, zumal dieses Enzym auch schon häufig in den Rahmen von Arbeiten über die Leberfibrose einbezogen wurde (16,2o,21,22,23,24). Takeuchi und Prockop (2o) sowie Langness et al. (22) fanden eine um einen Faktor 3 bis 4 erhöhte Prolinhydroxylaseaktivität in Rattenleber mit einer experimentellen Zirrhose. Risteli und Kivirikko (21,23) beschrieben 1974 und 1976 eine Aktivitätssteigerung um einen Faktor 2 im gleichen

System. Mann et al. (24) beobachtete 1979 eine um das 2 bis 3-fache erhöhte Prolinhydroxylaseaktivität in Humanleber in Abhängigkeit vom histopathologischen Erscheinungsbild der Leberfibrosen.

Die hier in den Myofibroblastenzellkulturen aus normaler und fibrotischer Leber gemessenen Enzymaktivitäten (fibrotische Zellen: Faktor 2 und mehr erhöht) stimmten gut vor allem mit den neueren Literaturwerten überein (s. 4.6.1.). Vergleicht man nun diesen Wert mit der mittleren Differenz der synthetisierten Kollagene zwischen normalen und fibrotischen Zellen (im Mittel ca. 4 mal mehr Kollagen in den Kulturen der fibrotischen Zellen), wird deutlich, daß bereits nach 24 Std. eine Anhäufung von Bindegewebsprotein in der Zellmatrix zu verzeichnen ist, die von der gemessenen Enzymaktivität nicht mehr wiedergespiegelt wird. Würde man die hier gemessene Differenz hochrechnen, ohne den Proteinabbau zu berücksichtigen, wäre im in vivo Zustand nach kürzester Zeit eine so große Menge an Kollagen in der Zellmatrix der Leber zu erwarten, daß keinerlei Stoffaustausch mehr möglich wäre. Dies stimmt nicht mit den klinischen Befunden einer sehr langsamen Entwicklung der Erkrankung überein. Hieraus wird klar, wie wichtig auf der einen Seite die genaue Untersuchung der Kollagenaseaktivitäten bei der Aufklärung der Regulation der Leberfibrose ist und wie wenig auf der anderen Seite die Messung der Prolinhydroxylase allein in der Leberbiopsie über den fibrotischen Zustand und auch über das fibrotische Geschehen aussagen kann.

Insgesamt kann auf Grund der vorliegenden Ergebnisse zusammengefaßt werden, daß schon frühzeitig die Rolle der abbauenden Enzyme im pathologisch gestörten Kollagenstoffwechsel bei der Leberfibrose bedeutungsvoll ist, so daß Arbeiten zur Regulation der Kollagenaseaktivitäten in der Zukunft von großer Wichtigkeit sein werden.

Die Bestimmung der Lysinoxidase, einem extrazellulären Enzym der Kollagenbiosynthese, war von großem Interesse, da auf die Messung seiner Aktivität neuerdings viele diagnostische Hoffnungen gesetzt werden. Als extrazelluläres Enzym könnte die Lysinoxidase im Gegensatz zur Prolinhydroxylase im Serum bzw. Plasma nachweisbar sein. In den Zellkulturen konnte jedoch keine bedeutende Aktivitätsdifferenz zwischen Zellen aus normaler und Zellen aus fibrotischer Leber beobachtet werden. Da die Höhe der Gesamtenzymaktivität ebenfalls nicht bedeutend war, kann geschlossen werden, daß die Rolle der Lysinoxidase im getesteten Stadium der Zellkultur noch gering ist und deshalb die Aktivität noch reprimiert ist, oder die de novo Biosynthese des Enzyms gerade erst anläuft.

Dieses Ergebnis kann auch die Erklärung geben für die Diskrepanz zwischen den Enzymmessungen in der Zellkultur und den Lysinoxidasespiegeln, die im Plasma von Patienten hier und auch in anderen Labors (Fuller, persönliche Mitteilungen) gefunden wurden: Es konnte eine deutlich erhöhte Lysinoxidaseaktivität im Plasma von einigen Patienten mit einer Leberfibrose beobachtet werden. Jedoch sind solche ersten Daten noch mit Vorsicht zu betrachten, da Artefakte durch andere pathologische Prozesse im Körper als die Leberfibrose nur sehr schwer auszuschließen

sind. Es ist durchaus denkbar, daß das Erscheinungsbild der Leberfibrose ohne die Beteiligung einer gesteigerten Lysinoxidaseaktivität zustandekommt. Um diese Frage zu klären, müßte im Tiermodell mit einer experimentellen Leberfibrose die zeitliche Verteilung der Anhäufung einzelner Zwischenprodukte der Kollagenbiosynthese im Lebergewebe untersucht werden.

5.5. Entwicklung eines Regulationsmodells der Bindegewebsproteinbiosynthese bei der Leberfibrose unter Einbeziehung der hier gewonnenen Ergebnisse in den heutigen Wissensstand

Das klinische Bild der Leberfibrose ist biochemisch auf die gesteigerte Biosynthese von Bindegewebe begründet. Die medizinische Ätiologie der Erkrankung ist bekannt (als klinische Übersicht siehe 141). Die biochemische Natur des Faktors, oder der Faktoren, die für die Auslösung und für die Aufrechterhaltung des fibrotischen Prozesses verantwortlich sind, ist weitgehend offen; die Regulation der Auslösung liegt vollständig im Dunkeln. Jedoch auch für den Mechanismus der Fibrosierung gibt es nur wenige Anhaltspunkte:

Diskutiert wird neben der Gesamtsteigerung der Kollagenbiosynthese, die sich vor allem auf enzymologische Arbeiten begründet, die Bedeutung verschiedener Kollagentypen für die Ausprägung bestimmter Strukturen, die als pathologisch zu betrachten sind. Es gibt Hinweise auf die Wichtigkeit der unterschiedlich starken Steigerung der Kollagentypen I und III. Der Einfluß einer Ausbildung von Basalmembranen um die Sinusoide auf den Stoffaustausch in der Leber wird ebenfalls in Erwägung gezogen.

Aus zellbiologischer Sicht ist die Frage nach der kollagenproduzierenden Zelle, oder den Zellen, offen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zu allen Punkten neue Ergebnisse oder vertiefende Daten in einem in vitro Modell gefunden. Besonders herauszustellen ist die Identifizierung einer Zelle, die offensichtlich eine bedeutende Rolle bei der Ausprägung der Leberfibrose spielt (s. 5.1. und 5.2.). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde das in Abb. 38 dargestellte Regulationsmodell zur Leberfibrose entwickelt.

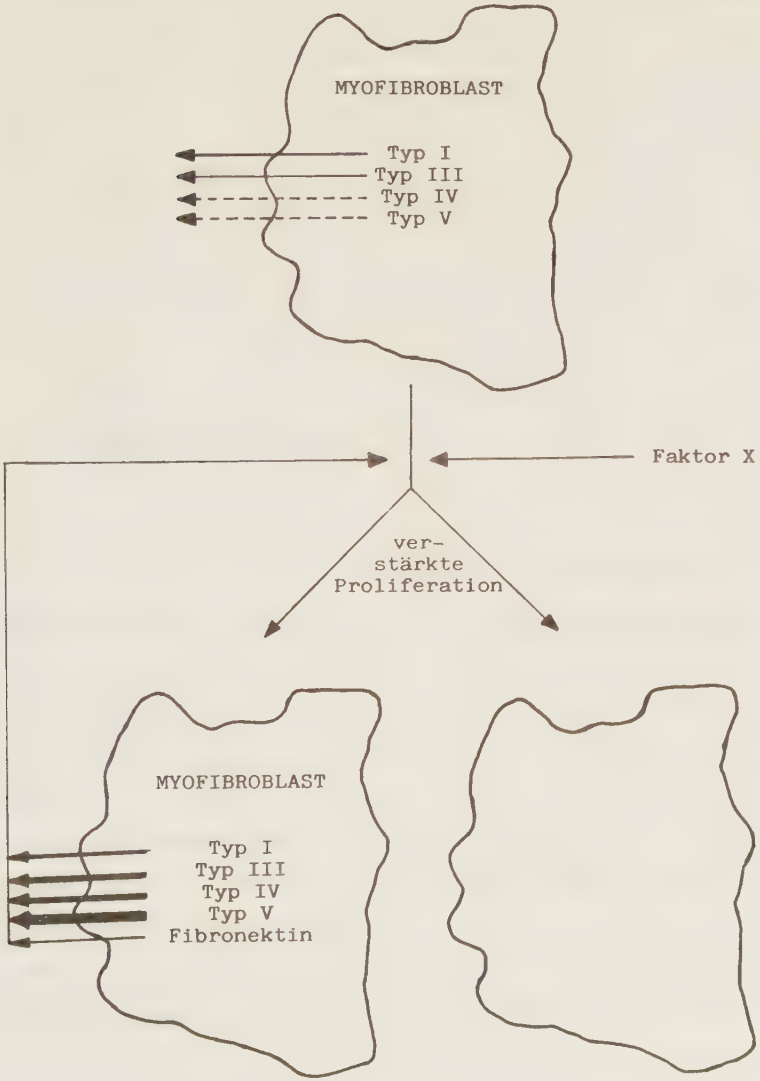
Die Bezeichnung "Faktor X" steht für den unbekannten Auslösefaktor für die Fibrosierung. Es wird hier beispielsweise die Bedeutung von Acetaldehyd bei der alkoholischen Leberzirrhose diskutiert (142).

Der Myofibroblast muß als Zelle angesehen werden, die auch in der gesunden Leber bereits ausgeprägt ist und eine Funktion hat. Eine Beziehung der hier isolierten und kultivierten Zellfraktion zu einer bestimmten Zellgruppe im Lebergewebe herzustellen, wäre rein spekulativ und soll aus diesem Grund auch nicht weiter versucht werden. Von großem Interesse wäre die Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Myofibroblasten, wodurch immunhistologisch eine Verbindung zwischen den biochemischen in vitro Daten und dem in vivo Zustand der Leber hergestellt werden könnte.

Die Einwirkung des "Faktor X" auf den Myofibroblasten führt auf der einen Seite zu einer verstärkten Proliferation dieser Zelle (s. 5.2.), auf der anderen Seite zu einer Steigerung und Veränderung seiner bindegewebsbiosynthestischen Aktivität.

Abb. 38

Regulationsmodell der Kollagenbiosynthese bei der Leberfibrose



Hier kommt es im Rahmen der Matrixkollagene zu einer besonders ausgeprägten Erhöhung der Biosynthese von Typ III Kollagen (s. 5.3.2.). Die bei der allgemeinen Charakterisierung von Typ III beschriebene Ausbildung eines retikulären Netzwerkes (28), korreliert mit dem histologischen Bild einer teilweise diffusen Zerstörung des Leberaufbaus durch Bindegewebe und der Umschnürung von einzelnen Hepatozyten, das nur schlecht mit der typischen gerichteten Faserstruktur (s. Abb. 1) des Typ I Kollagens in Verbindung gebracht werden kann. Darüberhinaus ist eine starke Vermehrung von Basalmembranenproteinen zu verzeichnen, die jedoch auf Grund ihrer Zusammensetzung höchstwahrscheinlich zu einer untypischen Basalmembranenstruktur führen (s. 5.3.4.).

Die durch die Biosyntheseprodukte hervorgerufenen Stoffwechselstörungen könnten in Form einer Rückkopplung den durch den "Faktor X" inizierten pathologischen Prozess verstärken.
In dem dargestellten Regulationsmodell ist die Degradation nicht berücksichtigt worden. Sie spielt jedoch eine wichtige Rolle bei der Gesamtregulation (s. 5.4.).

Zuletzt soll noch darauf aufmerksam gemacht werden, daß mit der Etablierung eines Tiermodells an Hand von neugeborenen Affen ein Weg beschritten wurde, auf dem weitere sehr grundlegende Kenntnisse zur Regulation der Leberfibrose erarbeitet werden könnten. Er stellt etliche interessante Methoden zur Verfügung, die für ein erweitertes Tiermodell mit experimenteller Leberfibrose bei subhumanen Primaten von großem Nutzen sein könnten. Ein solches Tiermodell brächte den großen Vorteil der Vereinheitlichung der Versuchsbedingungen mit sich, die bei Untersuchung von menschlichem Material mit größten Schwierigkeiten verbunden ist.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Biosynthese der Bindegewebsproteine Typ I, III, IV und V Kollagen, Fibronektin und Laminin durch eine definierte nicht hepatozytäre Zellart aus der Leber im Vergleich von gesundem und fibrotischem Gewebe untersucht. Alle Experimente wurden in dem Tiermodell neugeborener Affen etabliert, bevor sie auf humane Leber angewendet wurden. Dabei zeigte sich eine so gute Übertragbarkeit, daß sogar Vergleiche zwischen Affen- und Humangewebe möglich waren.

Es gelang erstmalig, zwei reine Zellpopulationen durch Dichtegradientenzentrifugation aus Lebergewebe von Primaten zu isolieren und in Primärkultur zu bringen. Die Zellen wurden nach morphologischen in vitro Beobachtungen "Myofibroblasten" und "endotheliale Zellen" genannt.

Durch ebenfalls erstmals durchgeführte vergleichende Untersuchung der Proliferationsgeschwindigkeit in Primärkultur der verschiedenen Zellfraktionen, isoliert aus normalem und fibrotischem Lebergewebe, konnte der Myofibroblast als die Zellart definiert werden, die die größere Bedeutung für die Ausbildung einer Fibrose im Gewebe hat.

Der Vergleich der Biosyntheseprodukte der beiden gereinigten Zellarten in der Primärkultur bestätigte diese Vermutung: Myofibroblasten zeigten nicht nur eine ca. 4 mal höhere Gesamtbindegewebsbiosyntheserate, wenn sie aus fibrotischer Leber isoliert worden waren, sondern auch eine starke Verschiebung im

Muster der einzelnen Bindegewebskomponenten, die in dieser Arbeit erstmals derart umfangreich in einem System miteinander verglichen wurden. Eine Umkehrung des Biosyntheseverhältnisses der interstitiellen Kollagene Typ I und III zugunsten von Typ III in den Zellen aus fibrotischer Leber wurde nachgewiesen. Eine 5-fache Steigerung bzw. eine Neusynthese von Basalmembranenproteinen wurde in fibrosierenden Zellen gefunden, wobei ein für Basalmembranen untypisches Proteinmuster auftrat.

Durch die zusätzliche Untersuchung an der Kollagenbiosynthese beteiligter Enzyme im gleichen System wurden erstmals Daten zur immer vernachlässigten Bedeutung des Bindegewebsabbaus bei der Regulation der Leberfibrose aufgezeigt.

An Hand der vorliegenden Daten konnte ein neues Modell zur Regulation der Leberfibrose beim Menschen entwickelt werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1 GEGENBAUR, C (1885) Bindegewebe. In: Lehrbuch der Anatomie des Menschen, 106-111

2 GALLOP, PM, BLUMENFELD, OO und SEIFTER, S (1972) Structure and metabolism of connective tissue proteins. Ann. Rev. Biochem. 41, 617-672

3 TRAUB, W, YONATH, A, und SEGAL, DM (1969) On the molecular structure of collagen. Nature 221, 914-917

4 GRANT, ME und PROCKOP, DJ (1972) The biosynthesis of collagen (3 Teile). New Engl. J. Med. 286, 194-199; 242-249; 291-300

5 RODEN, L (1978) Structure and metabolism of connective tissue proteoglycans. In: The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, Plenum Press, New York and London, 267-371

6 POPPER, H (1975) Overwiev of the past and future of collagen metabolism in the liver. In: Collagen Metabolism in the Liver, Stratton, New York, 227-233

7 GALAMBOS, JT und SHAPIRA, R (1973) Natural history of alcoholic hepatitis: IV. Glycosaminoglycuronans ans collagen in the hepatic connective tissue. J. Clin. Invest. 52, 2952-2962

8 HAHN, E, WICK, G, PENCEV, D und TIMPL, R (1980) Distribution of basement membrane proteins in normal and fibrotic human liver: collagen type IV, laminin and fibronectin. GUT 21, 63-71

9 WICK, G, BRUNNER, H, PENNER, E und TIMPL, R (1978) The diagnostic application of specific anti-procollagen sera. II. Analysis of liver biopsies. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 56, 316-324

10 VRACKO, R (1974) Basal lamina scaffold-anatomy and significance for maintenance of orderly tissue structure. Am. J. Pathol. 77, 314-338

11 GAY, S und MILLER, EJ (1978) Collagen in the Physiology and Pathology of Connective Tissue, Fischer, Stuttgart, New York

12 SCHAFFNER, F und POPPER, H (1963) Capillarization of hepatic sinusoids in man. Gastroenterology 44, 239-242

13 GAY, S FIETZECK, PP, REMBERGER, K, EDER, M und KÜHN, K (1975) Liver cirrhosis: Immunofluorescence and biochemical studies demonstrate two types of collagen. Klin. Wschr. 53, 205-208

14 KERSHENOBICH, D, FIERRO, FJ und ROJKIND, M (1970) The relationship between the free pool of proline and collagen content in human liver cirrhosis. J. Clin. Invest. 49, 2246-2249

15 ROJKIND, M und KERSHENOBICH, D (1975) Regulation of collagen synthesis in liver cirrhosis. Inhibition of fibrogenesis in rats and humans. In: Collagen Metabolism in the Liver, Stratton, New York, 129-138

16 KUUTTI-SAVOLAINEN, ER, RISTELI, J, MIETTINEN, TA und KIVIRIKKO, KI (1979) Collagen biosynthesis enzymes in serum and hepatic tissue in liver disease: I. Prolyl hydroxylase. Eur. J. Clin. Invest. 9, 89-95

17 ROJKIND, M GIAMBRONE, MA und BIEMPICA, P (1979) Collagen types in normal and cirrhotic liver. Gastroenterology 76, 710-719

18 ALLAM, S, VOSS, B und RAUTERBERG, J (1980) Initial absence of collagen synthesis in primary cultures of rat hepatocytes. In: Connective Tissue of the Normal and Fibrotic Human Liver, Thieme, Stuttgart (im Druck)

19 HATA, RJ, NINOMYA, Y, NAGAI, Y und TSUKADA, Y (1980) Biosynthesis of interstitial types od collagen by albumin-producing rat liver parenchymal cell (hepatocyte) clones in culture. Biochemistry 19, 169-176

20 TAKEUCHI, T und PROCKOP, DJ (1969) Protocollagen proline hydroxylase in normal liver and in hepatic fibrosis. Gastroenterology 56, 744-750

21 RISTELI, J und KIVIRIKKO, KI (1974) Activities of prolylhydroxylase, lysyl hydroxylase, collagen galactosyltransferase and collagen glucosyltransferase in the liver of rats with hepatic injury. Biochem. J. 144, 115-122

22 LANGNESS, U GRASEDYCK, K BORGMANN, J und LINDNER, J (1975) Collagen prolyl hydroxylase activity in experimental cirrhosis.In: Collagen Metabolism in the Liver, Stratton, New York, 73-77

23 RISTELI , J und KIVIRIKKO, KI (1976) Intracellular enzymes of collagen biosynthesis in rat liver as a

funktion of age and in hepatic injury induced by dimethylnitrosamine. Changes in prolyl hydroxylase lysyl hydroxylase, collagen galactosyltransferase and collagen glucosyltransferase activities. Biochem. J. 158, 361-367

24 MANN, SW, FULLER, GC, RODIL, JV und VIDINS, EJ (1979) Hepatic prolyl hydroxylase and collagen synthesis in patients with alcoholic liver disease. GUT 20, 825-832

25 RAMACHANDRAN, GN (1963) The tripel helical structure of collagen. In: Aspects of Protein Structure, Academic Press, New York, 39-55

26 KÜHN, K, GRASSMANN, W und HOFMANN, U (1960) Über den Aufbau der Kollagenfibrille aus Tropokollagen-molekeln. Naturwissenschaften 47, 258-259

27 HODGE, AJ und PETRUSKA, JA (1963) Recent studies with the electron microscope on ordered aggregates of the tropocollagen macromolecule. In: Aspects of Protein Structure, Academic Press, New York, 289-300

28 MÜLLER, P und KÜHN, K (1977) Collagen polymorphism in normal and osteoarthritic cartilage. Acta Rhum. Belg. 1, 23-25

29 KÜHN, K und FIETZECK, PP (1975) The structure of collagen. In: Collagen Metabolism in the Liver, Stratton, New York, 15-28

30 TANZER, M (1973) Cross-linking of collagen. Science 180, 561-566

31 HARWOOD, R, GRANT, ME und JACKSON, DS (1974) Collagen biosynthesis: characterzation of subcellular fractions from embryonic chick fibroblasts and the intracellular localization of protocollagen prolyl and protocollagen lysyl hydroxylase. Biochem. J. 144, 123-130

32 KIVIRIKKO, KI und MYLLYLÄ, R (1981) Collagen biosynthesis. Intracellular enzymes. In: Methods in Enzymology (im Druck)

33 PROCKOP, DJ, KIVIRIKKO, KI, TUDERMAN, L und GUZMAN, NA (1979) The biosynthesis of collagen and its disorders (2 Teile). New Engl. J. Med. 301, 13-23; 77-85

34 KIVIRIKKO, KI und MYLLYLÄ, R (1979) Collagen glycosyl-

transferases. Int. Rev. Conn. Tiss. Res. 8, 23-72

35 EHRLICH, HP und BORNSTEIN, P (1972) Microtubules in transcellular movement of procollagen. Nature (New Biol) 238, 257-260

36 DIEGELMANN, RF und PETERKOFSKY, B (1972) Inhibition of collagen secretion from bone and cultures fibroblasts by microtubular disruptive drugs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 892-896

37 LEUNG, MKK, FESSLER, LJ, GREENBERG, DB und FESSLER, JH (1979) Separate amino and carboxyl procollagen peptidases in chick embryo tendon. J. Biol. Chem. 254, 224-232

38 SIEGEL, RC (1979) Lysyl oxidase. Int. Rev. Conn. Tiss. Res. 8, 73-118

39 SUNDAR, RCV, CHURCH, RL KLOBUTCHER, LA und RUDDLE, FH (1977) Genetics of the connective tissue proteins: assignment of the gene for human type I procollagen to chromosome 17 by analysis of cell hybrids and microcell hybrids. Proc. Natl. Acad. Sci.USA 74, 4444-4448

40 SYKES, B und SOLOMON, E (1978) Assignment of a type I collagen structural gene to human chromosome 7. Nature 272, 548-549

41 PALMITER, RD, DAVIDSON, JM und GAGNON, J (1979) NH_2-terminal sequence of the chick pro α_1(I) chain synthesized in the reticulocyte lysate system. J. Biol. Chem. 254, 1433-1436

42 MILLER, EJ (1976) Biochemical characteristics and biological significance of the genetically-distinct collagens. Mol. Cell. Biochem. 13, 156-192

43 KUUTTI-SAVOLAINEN, ER, ANTTINEN, H MIETTINEN, TA und KIVIRIKKO, KI (1979) Collagen biosynthesis enzymes in serum and hepatic tissue in liver disease. II. Galactosylhydroxylysyl glucosyltransferase. Eur. J. Clin. Invest. 9, 79-101

44 SIEGEL, RC, CHEN, KH, GREENSPAN, JS und AGUIAR, JM (1978) Biochemical and immunochemical study of lysyloxidas in experimental hepatic fibrosis in the rat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2945- 2949

45 KENT, G, GAY, S, INOUYE, T, BAHN, R, MINICK, OT und

POPPER, H (1976) Vitamin A-containing lipocytes and formation of type III collagen in liver injury. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3719-3722

46 ROJKIND, M und MARTINEZ-PALOMO, A (1976) Increase in type I and type III collagens in human alcoholic liver cirrhosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 539-543

47 RISTELI, J (1977) Effect of prednisolone on the activities of the intracellular enzymes of collagen biosynthesis in rat liver and skin. Biochem. Pharmacol. 26, 1295-1298

48 CHVAPIL, M, MADDEN, JW und CARLSON, EC (1974) Effect of cis-hydroxyproline on collagen and other proteins in skin wounds, granuloma tissue, and liver of mice and rats. Exp. Mol. Pathol. 20, 363-373

49 ROJKIND, M und KERSHENOBICH, D (1975) Effect of colchicine on collagen, albumin and transferrin synthesis by cirrhotic rat liver slices. Biochim. Biophys. Acta 378, 415-423

50 MADDEN, JW, DAVIS, WM und BUTLER, CH (1973) Experimental esophageal lye burns. II. Correcting established strictures with beta-aminopropionitrile and bougienge. Ann. Surg. 178, 277-284

51 BARNES, MJ, MORTON, LP and LEVENE, CJ (1976) Synthesis of collagens types I and III by pig medial smooth muscle cells in culture. Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 339-347

52 BURKE, JM, BALIAN, G, ROSS, R und BORNSTEIN, P (1977) Synthesis of types I and III procollagen and collagen by monkey aortic smooth muscle cells in vitro. Biochemistry 16, 3243-3249

53 LAYMAN, DL, EPSTEIN, EH Jr, DODSEN, RF und TITUS, JL (1977) Biosynthesis od type I and III collagens by cultured smooth muscle cells from human aorta. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 671-675

54 ORREGO, M, ISRAEL, Y, TIEFENBACH, H, SALDIVIA, V, VARGHESE, G und MEDLINE, A (1979) Experimental fibrogenesis: enhancement by chronic ethanol administration. Alcoholism: Clin. Exp. Res. 3, 213-218

55 LIEBER, CS, DECARLI, LM und RUBIN, E (1975) Sequential production of fatty liver, hepatitis, and cirrhosis

in sub-human primates fed ethanol with adequate diets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 437-441

56 KRIEG, T, HÖRLEIN, D, WIESTNER, M und MÜLLER, PK (1978) Aminoterminal extension peptides from type I procollagen normalize excessive collagen synthesis of scleroderma fibroblasts. Arch. Dermatol. Res. 263, 171-180

57 KNOOK, DL und SLEYSTER, ECH (1976) Separation of Kupffer and endothelial cells of the rat liver by centrifugal elutriation. Exp. Cell Res. 99, 444-449

58 STEER, CJ und CLARENBURG, R (1979) Unique distribution of glycoprotein receptors on parenchymal and sinusoidal cells of rat liver. J. Biol. Chem. 254, 4457-4461

59 TIMPL, R, GLANVILLE, RW, NOWACK, H WIEDEMANN, H, FIETZECK, PP und KÜHN, K (1975) Isolation , chemical and electron microscopical characterization of neutral-salt-soluble type III collagen and procollagen from fetal bovine skin. Hoppe-Seyler`s Z. Physiol. Chem. 356, 1738-1792

60 NOWACK, H, OLSEN, BR und TIMPL, R (1976) Characterization of the amino-terminal segment in type III procollagen. Eur. J. Biochem. 70, 205-216

61 CHUNG, E und MILLER, EJ (1974) Collagen polymorphism: Characterization of molecules with the chain composition $[\alpha 1(III)]_3$ in human tissues. Science 183, 1200-1201

62 EPSTEIN, EH (1974) $[\alpha 1(III)]_3$ human skin collagen. Release by pepsin digestion and proponderance in fetal life. J. Biol. Chem. 249, 3225-3231

63 RHODES, RK und MILLER, EJ (1978) Physicochemical characterization and molecular organization of the collagen A and B chains. Biochemistry 17, 3442-3448

64 TIMPL, R, MARTIN, G, BRUCKNER, P, WICK, G und WIEDEMANN, H (1978) Nature of the collagenous protein in a tumor basement menbrane. Eur. J. Biochem. 84, 43-52

65 RISTELI, J, TUDERMAN, L und KIVIRIKKO, KI (1976) Intracellular enzymes of collagen biosynthesis in rat liver as a function of age and in hepatic injury produced by dimethylnitrosamine. Purification of

rat prolyl hydroxylase and comparison of changes in prolyl hydroxylase activity with changes in immunoreactive prolyl hydroxylase. Biochem. J. 158, 369-376

66 SIEGEL, RC (1974) Siosynthesis of collagen crosslinks: increased activity of purified lysyl oxidase with reconstituted collagen fibrils. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4826-4830

67 FUJIWARA, K, HAYASHI, S MISHIRO, S, OKA, H und ODA, T (1980) Stimulation of DNA synthesis by heated human serum in primary cultured normal adult rat hepatocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 96, 1135-1142

68 BURTON, K (1956) Biochem. J. 62, 315-323

69 LAEMMLI, UK (1970) Nature 227, 680-685

70 BONNER, WM und LASKEY, RA (1974) Eur. J. Biochem. 46, 83-88

71 FURTHMAYR, H und TIMPL, R (1971) Characterization of collagen peptides by sodium dodecylsulfate-polyacrylamid electrophoresis. Anal. Biochem. 41, 510-516

72 TIMPL, R, ROHDE, H, ROBEY, PG, RENNARD, SJ, FOIDART, JM und MARTIN, GR (1979) Laminin - a glycoprotein from basement membranes. J. Biol. Chem. 254, 9933-9937

73 MOSHER, DF, SAKSELA, O und VAHERI, A (1977) Synthesis and secretion of alpha-2-macroglobulin by cultured adherent lung cells. J. Clin. Invest. 60, 1036-1045

74 OUCHTERLONY, Ö (1949) Lancet 2, 346-348

75 CUTRONEO, KR und COUNTS, DF (1975) Anti-inflammatory steroids and collagen metabolism: glucocorticoid mediated alterations of prolyl hydroxylase activity and collagen synthesis. Mol. Pharmacol. 11, 632-639

76 MELET, J, VIANDEN, GDNE und BACHRA, BN (1977) Simplified assay for lysyl oxidase activity. Anal. Biochem. 77, 141-146

77 MARUSYK, R und SERGEANT, A (1980) A simple method for dialysis of small-volume samples. Anal. Biochem. 105, 403-404

78 LOWRY, OH, ROSEBROUGH, NJ, FARR, AL und RANDALL, RJ (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275

79 KÜHN, K, SCHUPPLER, G und KÜHN, J (1964) Z. Physiol. Chem. 338, 403-404

80 WOLFF, DA (1975) The separation of the cells and subcellular particles by colloidal silica density gradient centrifugation. In: Methods of Cell Biology, Academic Press, New York

81 SCHUHMACHER, M, SCHÄFER, G, HOLSTEIN, AF und HILZ, H (1978) Rapid isolation of mouse leydig cells by centrifugation in percoll density gradients with complete retention of morphological and biochemical integrity. FEBS Lett. 91, 333-338

82 PERTOFT, H, RUBIN, K, KJELLEN, L, LAURENT, TC und KLINGEBORN, B (1977) The viability of cells grown or centrifuged in a new density gradient medium, Percoll (TM). Exp. Cell Res. 110, 449-457

83 WISSE, E und KNOOK, DL (1979) The investigation of sinusoidal cells: a new approach to the study of the liver. In: Progress in Liver Diseases, Grune und Stratton, New York, Band VI, 153-171

84 CROUCH, E und BORNSTEIN, P (1978) Collagen synthesis by amniotic fluid cells in culture: characterization of a procollagen with three identical pro α1(I) chains. Biochemistry 17, 5499-5509

85 MARK, H vd und MARK, K vd (1979) Isolation and characterization of collagen A and B chains from chick embryos. FEBS Lett. 99, 101-105

86 BURKE, JM und ROSS, R (1979) Synthesis of connective tissue macromolecules by smooth muscle. Int. Rev. Conn. Tiss. Res. 8, 119-157

87 CHUNG, E, RHODES, RK und MILLER, EJ (1976) Isolation of three collagenous components of probable basement membrane origin from several tissues. Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 1167-1174

88 PROCKOP, DJ und UDENFRIEND, S (1960) A specific method for the analysis of hydroxyproline in tissues and urine. Anal. Biochem. 1, 228-239

89 ENGVALL, E und RUOSLATHI, E (1977) Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. Int. J. Cancer 20, 1-5

90 MOSESSON, MW und UMFLEET, RA (1970) The cold insoluble globulin of human plasma. J. Biol. Chem. 245, 5728-5736

91 CARDINAL, GJ und UDENFRIEND, S (1974) Prolyl hydroxylase. In: Advances in Enzymology, Vol.41, 245-300

92 NARAYANAN, AS, SIEGEL, RC und MARTIN, GR (1974) Stability and purification of lysyl oxidase. Arch. Biochem. Biophys. 162, 231-237

93 VARTIO, C, SEPPÄ, H und VAHERI, A (1981) Susceptibilty of soluble and matrix fibronectins to degradation by tissue proteineses, mast cell chymase and cathepsin 6. J. Biol. Chem. 256, 471-477

94 CROUCH, E und BORNSTEIN, P (1979) Characterization of a type IV procollagen synthesized by human amniotic fluid cells in culture. J.Biol. Chem. 254, 4197-4204

95 EMEIS, JJ und PLANQUE, B (1976) Heterogeneity of cells isolated from rat liver by pronase digestion: ultrastructure, cytochemistry and cell culture. J. Reticuloendoth. Soc. 20, 11-29

96 KNOOK, DL, BLANSJAAR, N und SLEYSTER, ECH (1977) Isolation and characterization of Kupffer and endothelial cells from the rat liver. Exp. Cell Res. 109, 317-329

97 KNOOK, DL und SLEYSTER, ECH (1980) Isolated parenchymal, Kupffer and endothelial rat liver cells characterized by their lysosomal enzyme content. Biochem. Biophys. Res. Commun. 96, 250-257

98 MICHALOPOULOS, G und PITOT, HC (1975) Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. Exp. Cell Res. 94, 70-78

99 GOLD, LJ und PEARLSTEIN, E (1980) Fibronectin-collagen binding and requirement during cellular adhesion. Biochem. J. 186, 551-559

100 RUBIN, K, JOHANSSON, S PETTERSSON, J, OCKLIND, C, ÖKBRINK, B und HÖÖK, M (1979) Attachment of rat hepatocytes to collagen and fibronectin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 91, 86-94

101 GABBIANI, G, HIRSCHEL, GJ, RYAN, GB, STATKOV, PR und MAJNO, G (1972) Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and funktion. J. exp. Med. 135, 719-734

102 GABBIANI, G, CHAPONNIER, C und HÜTTNER, I (1978)

Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing. J. Cell Biol. 76, 561-568

103 GABBIANI, G (1979) The role of the contractile proteins in wound healing and fibrocontractive diseases. Achiev. exp. Pathol. 9, 187-206

104 IRLE, C, KOCHER, O und GABBIANI, G (1980) Contractility of myofibroblasts during experimental liver cirrhosis. J. Submicrosc. Cytol. 12, 209-217

105 BHATHAL, PS (1972) Presence of modified fibroblasts in cirrhotic livers in man. Pathology 4, 139-144

106 RUDOLPH, R, MCCLURE, WJ und WOODWARD, M (1979) Contractile fibroblasts in chronic alcoholic cirrhosis. Gastroenterology 76, 704-709

107 FRANKE, WW, SCHMID, E, KARTENBECK, J, MAYER, D, HACKER, HJ, BANNASH, P, OSBORN, M, WEBER, K, DENK, H, WANSON, JC und DROCHMANS, P (1979) Characterization of the intermediate-sized filaments in liver cells by immunofluorescence and electron microscopie. Biol. Cellulaire 34, 99-110

108 WIGLEY, CB (1975) Differentiated cells in vitro. Differentiation 4, 25-38

109 BURKE, JM und ROSS, R (1977) Collagen synthesis by monkey arterial smooth muscle cells during proliferation and quiescence in culture. Exp. Cell Res. 107, 387-395

110 VAHERI, A, KURKINEN, M, LEHTO, VP, LINDER, E und TIMPL, R (1978) Codistribution of pericellular matrix proteins in cultured fibroblasts and loss in transformation: fibronectin and procollagen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4944-4948

111 KRIEG, T, AUMAILLY, M, DESSAU, W, WIESTNER, M und MÜLLER, P (1980) Synthesis of collagen by human fibroblasts and their SV 40 transformants. Exp. Cell Res. 125, 23-30

112 VOSS, B, RAUTERBERG, J, ALLAM, S und POTT, G (1980) Distribution of collagen type I and type III and of two collagenous components of basement membranes in the human liver. Path. Res. Pract. 170, 50-60

113 ROHDE, H, VARGAS, L, HAHN, E, KALBFLEISCH, H,

BRUGUERA, M und TIMPL, R (1979) Radioimmunoassay for type III procollagen peptide and its application to human liver disease. Eur. J. Clin. Invest. 9, 451-459

114 EPSTEIN, EH, jr (1974) $[\alpha 1(III)]_3$ human skin collagen. Release by pepsin digestion and preponderance in fetal life. J. Biol. Chem. 249, 3225-3231

115 LAMERZ, R und FATCH-MOGHADAM, A (1975) Carcinofetale Antigene. II. Carcinoembryonales Antigen. Klin. Wschr. 53, 193-203

116 SEYER, JM, HUTCHESON, ET und KANG, AH (1976) Collagen polymorphism in idiopathic chronic pulmonary fibrosis. J. Clin. Invest. 57, 1498-1507

117 CHUNG, E und MILLER, EJ (1974) Collagen polymorphism: characterization of molecules with the chain composition $[\alpha 1(III)]_3$ in human tissues. Science (Wash.D.C.) 183, 1200-1201

118 CANDRARAJAN, J (1978) Separation of type III collagen from type I collagen and pepsin by differential denaturation and renaturation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 83, 180-186

119 JUVA, K und PROCKOP, DJ (1966) Modified procedure for the assay of H^3- or C^{14} -labeled hydroxyproline. Anal. Biochem. 15, 77-83

120 SEYER, JM, HUTCHESON, ET und KANG, AH (1977) Collagen polymorphism in normal and cirrhotic human liver. J. Clin. Invest. 59, 241-248

121 HOWARD, DJ, READ, AE und BAILEY, AJ (1975) Characterization of the collagen of the normal and cirrhotic human liver. GUT 16, 827

122 SATO, T und SPIRO, RG (1976) Studies on the subunit composition of the renal glomerular basement membrane. J. Biol. Chem. 251, 4062-4070

123 HARPER, E (1980) Collagenases. Ann. Rev. Biochem. 49, 1063-1078

124 KEFALIDES, NA (1978) Biology and Chemistry of Basement Membranes, Academic Press, New York

125 KEFALIDES, NA und DENDUCHIS, B (1969) Structural components of epithelial and endothelial basement

membanes. Biochemistry 8, 4613-4621

126 DANIELS, JR und CHU, GH (1975) Basement membrane collagen of renal glomerulus. J. Biol. Chem. 250, 3531-3537

127 TRYGGVASON, K und KIVIRIKKO, KI (1978) Heterogeneity of pepsin-solubilized human glomerular basement membrane collagen. Nephron 21, 230-235

128 SAGE, H, WOODBURY, RG und BORNSTEIN, P (1979) Structural studies on human type IV collagen. J. Biol. Chem. 254, 9893-9900

129 GLANVILLE, RW, RAUTER, A und FIETZECK, PP (1979) Isolation and characterization of a native placental basement membrane collagen and its component α chains. Eur. J. Biochem. 95, 383-389

130 ALITALO, K, VAHERI, A, KRIEG, T und TIMPL, R (1980) Biosynthesis of two subunits of type IV procollagen and of other basement membrane proteins by a human tumor cell line. Eur. J. Biochem. 109, 247-255

131 CROUCH, E, SAGE, H und BORNSTEIN, P (1980) Structural basis for apparent heterogeneity of collagens in human basement membranes: type IV procollagen contains two distinct chains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 745-749

132 TRYGGVASON, K, ROBEY, PG und MARTIN, GR (1980) Biosynthesis of type IV procollagens. Biochemistry 19, 1284-1289

133 ROHDE, H, WICK, G und TIMPL, R (1979) Immunochemical characterization of the basement membrane glycoprotein laminin. Eur. J. Biochem. 102, 195-201

134 TIMPL, R, ROHDE, H, RISTELI, L, OTT, U und MARTIN, G Laminin (in Vorbereitung).

135 SASSE, J, MARK, H vd, und MARK, K vd (1978) AB-collagen: new marker for studies of muscle differentiation. J. Cell Biol. 79, A 323

136 SCHAFFNER, F (1970) The structural basis of altered hepatic function in viral hepatitis. Am. J. Med. 49, 658-668

137 SAMBE, K, TSUCHIGA, M, KAMEGAYA, K, ODA, M, OKAZAKI, J, MARAYAMA, K, OSHIO, T und FUNASTSU, K (1972)

Electron microscopic studies on the degradation and resorption of collagen fibers in experimental hepatic fibrosis. Jap. J. Gastroenterol. 69, 808-823

138 GAY, S, INOUYE, T, KENT, G und POPPER, H (1976) Basement membrane formation in experimental hepatic injury. Gastroenterology 71, 907-912

139 TANIKAWA, K (1975) Ultrastucture of hepatic fibrosis and fat storing cells. In: Collagen Metabolism in the Liver, Stratton, New York, 93-99

140 GRIMAUD, JA, DRUGUET, M, PEYROL, S, CHEVALIER, O, HERBAGE, D und BADRAWY, N (1980) Collagen immunotyping in human liver: light and electron microscope study. J. Histochem. Cytochem. 28, 1145-1165

141 POPPER, H (1978) Die Leberfibrose - Entstehung, Dynamik und klinische Bedeutung. Leber, Magen, Darm 8, 65-72

142 LIEBER, CS (1980) Alcohol, protein metabolism, and liver injury. Gastroenterology 79, 373-390

LEBENSLAUF

1.5.54	geboren als Tochter von Helene und Fritz Krauledat in Nienburg/Weser
1960-1964	Besuch der Volksschule in Nienburg/Weser
1964-1973	Hindenburgschule, mathematisch-naturwissenschaftlich-neusprachliches Gymnasium in Nienburg/Weser
Mai 1973	Reifeprüfung
1973-1977	Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
Dez. 1975	Diplom-Vorexamen
Juni 1977	mündlicher Teil der Diplom-Hauptprüfung
Juni 1977-Juni 1978	experimentelle Diplomarbeit über das Thema "Versuche zur Regulation der Cholesterinester-Hydrolase aus Nebennierenrinde vom Rind"
Juni 1978-Nov. 1979	Weiterarbeit als wissenschaftliche Hilfskraft an der Thematik der Diplomarbeit am Institut für Physiologische Chemie I(Arbeitsgruppe für Bioorganische Chemie) der Ruhr-Universität Bochum
Dez. 1979-April 1981	wissenschaftliche Assistentin im DFG-Projekt Ha 956/4 an der Medizinischen Universitätsklinik Marburg; während dieser Zeit bis
Juni 1981	Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit